

DETERMINACIÓN EXPERIMENTAL DE CINÉTICAS DE INACTIVACIÓN TÉRMICA DE ENZIMAS EN HORTALIZAS CRUCÍFERAS PARA LA OPTIMIZACIÓN DEL PROCESAMIENTO INDUSTRIAL DE VEGETALES PRE-COCIDOS CONGELADOS

Tesis de Maestría

JOHN F. PÉREZ-CALDERÓN

**Presentada ante la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional
de La Plata como requisito para la obtención del grado académico de**

Magister en Tecnología e Higiene de los Alimentos

Dirección de tesis:

Directora: Prof. Dra.Ing. Noemí Zaritzky

Co-Directora: Dra. Ing. Victoria Santos

Jurado de Tesis:

Dra. Lia Gerschenson. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales-
Universidad de Buenos Aires

Dra Viviana Salvadori. Facultad de Ingeniera-
Uniersidad Nacional de la Plata

Dr. Gustavo Martínez. Facultad de Ciencias Exactas-
Universidad Nacional de la Plata

Fecha de la Defensa oral y pública: 5 de abril de 2019



Maestría en Tecnología e Higiene de los Alimentos

Universidad Nacional de La Plata

El presente trabajo de Tesis se realizó para optar al título de Magister en Tecnología e Higiene de los Alimentos, programa acreditado por CONEAU con Categoría A (Res. 418/12).

Se llevó a cabo en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), bajo la dirección de la Dra. Noemí Zaritzky y Dra. M. Victoria Santos



CIDCA

En memoria de mi padre y abuelo, quienes siempre se sintieron orgullosos de mí. La disciplina y compromiso de mi padre y las ganas de luchar siempre por un mejor mañana de mi abuelo serán un ejemplo e inspiración para mi vida profesional y personal.

Padre, tu muerte prematura y los lindos recuerdos como tu sonrisa, me dio la fortaleza necesaria para no dejar de soñar aún cuando quise rendirme.

También quiero dedicar este trabajo a mi madre por ser el pilar fundamental en mi educación, su incondicionalidad y gran fortaleza son mi mejor compañía.

AGRADEZCO

A Dios por los grandes momentos que me ha permitido vivir, se es alguien cuando se cree en algo.

A mis padres, en ningún momento de mi vida me he sentido solo, ustedes me han dado lo mejor, su constante ayuda sirvió para que esté sueño se inmortalice. Gracias madre porque eres un ejemplo de vida, tu fortaleza me mantiene unido a ti a pesar de la distancia, sabes que eres mi amada. Padre siempre tus recuerdos vivirán en mi memoria, no estuviste presente para compartir los resultados que claramente fuiste participe, junto a mi madre abonaste un gran campo que ahora da frutos. El amor y disciplina de los dos me llena de alegría.

A mis directoras de tesis. Mimi tu gran gran experiencia siempre encaminó mi investigación, me enseñaste a encarar los resultados con aptitud reflexiva, siempre me brindaste los recursos para la construcción de este proyecto, de verdad tu vida profesional es una inspiración, me gustó contar con tu poder de decisión mezclado con fortaleza y nobleza. Vicky, agradezco tu confianza a nivel experimental, gracias por enseñarme a aprender de toda clase de resultados, a potencializar mis habilidades y a ser inquieto, tu ayuda fue importante en todo momento instaurando la idea de trabajo holístico.

A mi Hermana, tu amistad es importante para mi, eres parte de mis días, tu linda forma de ser hacen que mis mañanas sean dulces, siempre me despierto pensando en ti y en la promesa de poder algún día compartir físicamente nuestras vidas alejadas por kilómetros de distancia pero unidas por una sola estrella, te admiro y eres un ejemplo de superación y constancia.

Alejandro gracias por ser mi compañero de viaje, por tomar la mochila junto a mi y decidir alejarnos de la zona de confort para poder construir un gran sueño, gracias por estar presente en todos los momentos más importantes en la construcción de este proyecto, por escucharme y aconsejarme, por enseñarme a no ponerle límites a la vida.

Agradezco a mi abuelo Julio y sus enseñanzas, no fue fácil soportar la idea de su muerte, pero ahora entiendo que este episodio fortaleció mi personalidad. Titi, eres la ternura encarnada, los recuerdos de tu cara son de las cosas bellas que me hacen sentir acompañado, te amo abuelita. Gracias tía Fany, por solventar mis sueños, tus experiencias y maternidad hacen que este logro también sea tuyo. A mis tíos Calderón por demostrar y ser una familia unida, nunca los olvidaré y son un ejemplo de constancia y superación, con nobleza y rectitud se logran grandes cosas.

A mis amigos que conocí durante la Maestría como Andrea, Juliana y Sara, ustedes se convirtieron en un trozo de Colombia, compartimos de todo, cenas, café y risas. A Ana Caro por ser una gran compañera, compartimos muchos espacios en común enseñándonos muchas cosas útiles para la vida. A todos los compañeros del instituto que me brindaron ayuda incondicional para el desarrollo de habilidades experimentales.

Gracias a todo el cuerpo docente de la Maestría, los contenidos teórico/prácticos brindados sirvieron para crecer profesionalmente, siento orgullo haber sido parte de este programa de posgrado.

“La naturaleza tiene perfecciones para demostrar que es imagen de Dios e imperfecciones para probar que sólo es una imagen”

Bertolt Brecht

RESUMEN

La simulación computacional aplicada a procesos de transferencia de energía en alimentos constituye una herramienta fundamental para el desarrollo de nuevas tecnologías y metodologías de trabajo para producir vegetales pre-cocidos congelados. Los repollitos de Bruselas (*Brassica oleracea* L. *gemmifera*) y el brócoli (*Brassica oleracea* L. *italica*) son vegetales del género *Brassica* (comúnmente conocidos como crucíferas) que contienen un alto contenido en compuestos bio-activos y fibra alimentaria. Las crucíferas también contienen múltiples nutrientes con potentes propiedades anti-cancerígenas. Numerosos estudios epidemiológicos documentan sobre la prevención de diferentes tipos de cáncer asociados al consumo de brócoli, esto se debe al contenido de compuestos antioxidantes, dentro de estos se encuentran los glucosinolatos, polifenoles, vitaminas y carotenoides. Por lo tanto un alto contenido de nutrientes benéficos para la salud que ayudan a la prevención de enfermedades incentiva el incremento de consumo de estos vegetales en la dieta. Partiendo de los nuevos hábitos de consumo de la población, los vegetales pre-cocidos congelados están ganando popularidad debido a que acortan tiempos de preparación conservando las características nutricionales.

Optimizar el procesamiento industrial para la obtención de vegetales pre-cocidos congelados como los repollitos de Bruselas es un reto en la industria, debido a que existen una serie de reacciones enzimáticas que deterioran el producto final; por lo tanto en este trabajo de tesis se determinó experimentalmente las cinéticas de inactivación enzimática para la peroxidasa (POD) y lipoxigenasa (LOX) en repollitos de Bruselas y brócoli, encontrando que existen dos fracciones térmicamente diferentes (fracciones termo-lábil y termo-resistente). Usando regresiones no lineales se pudo calcular las fracciones iniciales de isoenzima resistente (α_R) y las constantes cinéticas de reacción del proceso de inactivación térmica (k).

El proceso térmico se simuló resolviendo las ecuaciones diferenciales que representan la transferencia de energía en estado no estacionario usando el software COMSOL Multiphysics 3.5a; se tuvo en cuenta la geometría irregular del vegetal considerando el sistema como un sólido de revolución. Se acopló al programa de simulación de

transferencia de energía, la cinética de inactivación térmica de ambas enzimas calculando a cada tiempo la actividad enzimática residual en todo el dominio del alimento. Las predicciones numéricas de las historias térmicas concordaron satisfactoriamente con los resultados experimentales para los procesos de pre-cocción. El proceso de congelación se estudió utilizando un modelo numérico desarrollado por el grupo de investigación. El modelo permitió simular el proceso de congelación de los repollitos de Bruselas obteniendo una excelente concordancia entre los resultados predichos numéricamente y los registrados experimentalmente. Para la aplicación de esta metodología de simulación fue necesario realizar un cambio de variable, especialmente cuando se trata de procesos de congelación. El cambio de variable se basa en integrar las propiedades termofísicas del vegetal (calor específico, conductividad térmica y densidad) en función de la temperatura para obtener la función Entalpía vs. Temperatura y la función Kirchhoff vs. Temperatura.

Se evaluaron atributos de calidad luego de la pre-cocción y posterior al almacenamiento congelado a -20°C durante 4 meses. Se relacionó el efecto de la actividad enzimática residual con los cambios de textura, color y contenido de ácido ascórbico, en la zona interna (apical) y en la capa exterior del vegetal. En el caso de tiempos cortos de pre-cocción a alta temperatura (3 minutos- 90°C) se observó una reactivación enzimática después del almacenamiento. Este fenómeno de reactivación se relacionó con un incremento en el pardeamiento del vegetal y una disminución del contenido de ácido ascórbico. Asimismo, se realizó una evaluación sensorial de aceptabilidad global del producto. Mediante el análisis de resultados experimentales y numéricos se concluyó que el tiempo óptimo de pre-cocción correspondió a 6 minutos (90°C) lo cual permitía una inactivación enzimática adecuada para obtener un producto de alta calidad.

Los resultados alcanzados en esta de tesis fueron publicados en:

Revista internacional con referato:

Pérez- Calderón, J., Califano, A., Santos, M. V., Zaritzky, N. (2017). Kinetic Parameters for the Thermal Inactivation of Peroxidase and Lipoxigenase in Precooked Frozen Brassica Species. *Journal of Food Science*, 82(6), 1378-1386.

Actas de reuniones académicas (Congresos, jornadas, etc.)

- Simulación Numérica del Procesamiento Integral de Vegetales Precocidos Congelados Acoplando las Cinéticas de Inactivación Enzimática de Peroxidasa y Lipoxigenasa en la etapa de Pre-Cocción.
Pérez-Calderón J, Santos MV, Califano A, Zaritzky N.
Cuartas Jornadas de Investigación, Transferencia y Extensión
Abril de 2017, Plata, Argentina. Modalidad: Poster
- Estudio de cinéticas de inactivación enzimática y su relación con parámetros de calidad en vegetales pre-cocidos congelados.
Pérez-Calderón J, Santos MV, Califano A, Zaritzky N.
VI Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos,
2 al 4 de Noviembre de 2016, Córdoba Capital. Modalidad: Poster.
- Estudios de inactivación enzimática en vegetales pre-cocidos congelados y su relación con atributos de calidad y vitamina C.
Pérez-Calderón J, Santos MV, Califano A, y Zaritzky N.
Jornada ¿Por qué debemos consumir frutas y hortalizas? ¿Qué hay de nuevo?
Foro de la Alimentación, La nutrición y La Salud, 11 de Octubre de 2016, Buenos Aires Capital Federal. Modalidad: Poster- Oral
- Relación entre parámetros cinéticos de inactivación enzimática y aspectos de calidad en vegetales pre-cocidos congelados.
Pérez-Calderón J, Santos MV, Califano A, Zaritzky N.
XXXI Congreso Argentino de Química, 25 al 28 de Octubre de 2016, Buenos Aires Distrito Federal. Modalidad: Poster.
- Cinéticas de Inactivación Térmica de las Enzimas Peroxidasa y Lipoxigenasa en Vegetales.
Pérez-Calderón J, Santos MV, Califano A, Zaritzky N.
INNOVA + CIBIA 2015.
Montevideo-Uruguay, 7 al 9 Octubre de 2015. Modalidad: Poster
- Obtención de la cinética de inactivación térmica de peroxidasa en crucíferas para la optimización del proceso industrial de vegetales precocidos congelados.
J. Pérez-Calderón J, Santos MV, Califano A, Zaritzky N.
3 Jornada de investigación y transferencia, Facultad de ingeniería UNLP, Abril 20 al 22 de 2015. Modalidad: Poster.
- Utilización de modelos numéricos para la optimización del tratamiento térmico en vegetales acoplado la cinética de inactivación de peroxidasa. Pérez-Calderón J, Santos MV, Califano A, Zaritzky N, N
IV Congreso Latinoamericano de Ingeniería y Ciencias Aplicadas a la Industria.
San Rafael- Mendoza, Argentina. 15 al 17 de abril de 2015. Modalidad: Poster.

- Optimización del tratamiento térmico de vegetales precocidos congelados acoplando la cinética experimental de inactivación enzimática al modelo numérico de simulación.
 Pérez-Calderón J, Santos MV, Califano A, Zaritzky N.
 XV Congreso Argentino de ciencia y Tecnología de Alimentos.
 Asociación Argentina de Tecnólogos
 Noviembre 3 al 5 de 2015
 Modalidad: Poster- Presentación Oral
- Determinación de la cinética de inactivación térmica de peroxidasa en crucíferas para la optimización del proceso industrial de vegetales precocidos congelados.
 Pérez-Calderón J, Santos MV, Califano A, Zaritzky N. V Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Córdoba, Argentina. 17 a 18 de noviembre de 2014. Modalidad: Presentación oral.
- Obtención de cinéticas de inactivación enzimática en crucíferas para la optimización industrial de vegetales precocidos congelados.
 Pérez-Calderón J, Santos MV, Califano A, Zaritzky N.
 1ª Jornada de tesis de posgrado, Escuela de Postgrado y Educación Continua
 Fac. Ingeniería UNLP, Octubre 10 de 2014.
 Modalidad: Presentación oral.
- Heat transfer coupled with enzyme inactivation in the processing of pre-cooked frozen cruciferous vegetables.
 Pérez-Calderón J, Santos MV, Califano A, Zaritzky N.
 17th IUFOST World Congress of Food Science and Technology.
 Montreal Canada, Agosto 18 de 2014. Modalidad: Presentación oral.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	2
1.2. GENERALIDADES DE LOS VEGETALES ESTUDIADOS	5
1.2.1. Brócoli (<i>Brassica oleracea</i> L. <i>italica</i>)	5
1.2.2. Repollito de bruselas (<i>Brassica oleracea</i> L. <i>gemmifera</i>)	7
1.2.3. Cultivo y comercialización	9
1.2.4. Alimentos congelados listos para consumir	9
1.2.5. Problemática del sector de vegetales pre-cocidos congelados	11
1.2.6. Generalidades del procesamiento térmico en vegetales	12
1.2.7. Enzimas en el procesamiento de vegetales	14
1.2.8. Optimización industrial del procesamiento de vegetales precocidos congelados	17
1.3. OBJETIVOS	19
1.4. ESQUEMA GENERAL DE TESIS	22
2. CINÉTICAS DE INACTIVACIÓN ENZIMÁTICA EN BRÓCOLI (BRASSICA OLERACEA L. ITÁLICA) Y REPOLLITOS DE BRUSELAS (BRASSICA OLERACEA L. GEMMIFERA)	25
2.1. OBJETIVOS DEL CAPITULO	25
2.2. GENERALIDADES DE LAS ENZIMAS Y DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	25
2.2.1. Cinética enzimática	27
2.3. ENZIMAS INDICADORAS DE LA CALIDAD EN VEGETALES	28
2.3.1. Lipoxigenasa	28
2.3.2. Peroxidasa	31
2.4. MATERIALES Y MÉTODOS	34
2.4.1. Composición proximal	34
2.4.2. Preparación del extracto enzimático e inactivación enzimática	34
2.4.3. Determinación de la actividad enzimática	36
2.4.4. Análisis estadístico	36
2.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
2.5.1. Composición proximal	38

2.5.2. Cinéticas de inactivación térmicas	38
2.6. CONCLUSIONES PARCIALES.....	50
3. SIMULACIÓN DEL PRE-TRATAMIENTO TÉRMICO EN REPOLLITOS DE BRUSELAS (<i>BRASSICA OLERACEA</i> L. <i>GEMMIFERA</i>) ACOPLANDO LAS CINÉTICAS DE INACTIVACIÓN ENZIMÁTICA.....	53
3.1. OBJETIVOS DEL CAPITULO	53
3.2. PROCESAMIENTO TÉRMICO Y SIMULACIÓN COMPUTACIONAL.....	54
3.3. MODELADO MATEMÁTICO	54
3.4. MÉTODO DE LOS ELEMENTOS FINITOS	55
3.5. PROBLEMAS DE TRANSFERENCIA DE CALOR SIN CAMBIO DE FASE (PROBLEMAS LINEALES).....	56
3.6. SIMULACIÓN DEL PROCESO USANDO COMSOL MULTIPHYSICS	59
3.7. MATERIALES Y MÉTODOS	60
3.7.1. Formulación en elementos finitos del problema lineal acoplando las cinéticas de inactivación.....	60
3.7.2. Generación de la malla y determinación del contorno irregular	60
3.7.3. Determinación de las propiedades térmicas del Repollito de Bruselas y coeficientes de transferencia calórica	62
3.7.4. Validación experimental del modelo numérico durante el calentamiento y enfriamiento de los vegetales.....	67
3.7.5. Aplicación del modelo numérico desarrollado para predecir tiempo de procesamiento y actividad enzimática residual	68
3.7.6. Variación de parámetros de calidad después del pre-tratamiento térmico y el enfriamiento.....	70
3.7.7. Análisis estadístico	75
3.8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	75
3.8.1. Generación de la malla	75
3.8.2. Densidad del vegetal y propiedades termofísicas.....	76
3.8.3. Validación del proceso de pre-calentamiento del vegetal	78
3.8.4. Modelado de la Inactivación Enzimática	81
3.8.5. Parámetros de calidad después del pre-tratamiento térmico en repollitos de Bruselas	84
3.9. CONCLUSIONES PARCIALES.....	90

4. SIMULACIÓN DEL PROCESO DE CONGELACIÓN DE REPOLLITOS DE BRUSELAS	93
4.2. OBJETIVOS DEL CAPITULO	93
4.3. GENERALIDADES DE LOS VEGETALES PRE-COCIDOS CONGELADOS ..	93
4.4. MATERIALES Y MÉTODOS	95
4.4.1. Modelado matemático.....	95
4.4.2. Propiedades termofísicas	98
4.4.3. Determinación del coeficiente de transferencia de calórica del medio usado para la congelación	99
4.4.4. Generación de la malla	99
4.4.5. Validación experimental de las soluciones analíticas para el proceso de congelación	100
4.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	101
4.5.1. Propiedades termofísicas y coeficiente de transferencia	101
4.5.2. Aplicación del modelo numérico y validación para predecir tiempos de congelación	104
4.6. CONCLUSIONES PARCIALES.....	105
5. CORRELACIÓN DE PARÁMETROS DE CALIDAD CON LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DURANTE EL ALMACENAMIENTO CONGELADO	107
5.1. OBJETIVOS DEL CAPITULO	107
5.2. REPOLLITOS DE BRUSELAS PRE-COCIDOS CONGELADOS	107
5.3. MATERIALES Y MÉTODOS	109
5.3.1. Ensayo de almacenamiento congelado de los repollitos pre-cocidos	109
5.3.2. Determinación de cambios en parámetros de calidad	109
5.3.3. Evaluación sensorial	110
5.3.4. Análisis estadístico	113
5.4. Resultados y discusión.....	114
5.4.1. Variación en el porcentaje de actividad enzimática (%AE)	115
5.4.2. Reactivación enzimática posterior a los tratamientos térmicos.....	119
5.4.3. Variación en el porcentaje de ácido ascórbico residual (%AA).....	121
5.4.4. Variación del color	125
5.4.5. Variación de parámetros de textura	128

5.4.6. Resultados de la evaluación sensorial.....	130
5.5. CONCLUSIONES PARCIALES.....	134
6. CONCLUSIONES GENERALES.....	136
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	139



CAPITULO 1 **INTRODUCCIÓN**



1. INTRODUCCIÓN

Los vegetales brindan en la dieta humana minerales, nutrientes y energía, su consumo ayuda a prevenir enfermedades como el cáncer y diferentes cardiopatías (Cohen, Kristal, y Stanford, 2000; Gonçalves y col., 2009). Datos mundiales presentados por la FAO (2003) sobre la salud afirman que la ingesta insuficiente de vegetales es uno de los 10 factores de riesgo principales que contribuyen a la mortalidad. Dentro de la familia de las crucíferas (*Brassicaceae*) se encuentra una gran cantidad de especies las cuales tienen un alto impacto debido a que son extensamente cultivadas y consumidas como alimento fresco e industrializado; además se usan como plantas forrajeras, medicinales y ornamentales (Aires, 2015; Gómez-Campo y Prakash, 1999). Dentro de esta familia se destacan los géneros *Brassica* y *Raphanus* como los más difundidos y utilizados por su producción.

El consumo de las especies hortícolas de la familia, especialmente del género *Brassica*, ha ido aumentando en muchos países, ya que se le reconocen múltiples efectos benéficos para la salud; esto se debe a que son alimentos ricos en fibra, compuestos antioxidantes como polifenoles (Podsdek, 2007), ácido ascórbico, carotenoides (Bernhardt y Schlich, 2006; Singh, Upadhyay, Prasad, Bahadur, y Rai, 2007) y además presentan compuestos con características anticancerígenas como los glucosinolatos (Fahey, Zalcmann, y Talalay, 2001); todos estos ayudan al retardo del envejecimiento celular, la prevención de ciertas enfermedades incluyendo cáncer de mama, pulmón entre otros y la reducción del colesterol.

Estas cualidades han llevado a que diversos estudios recomienden su incorporación en la dieta. La familia botánica comprende especies originadas en zonas de clima templado, por lo que están adaptadas a desarrollarse y crecer en zonas con temperaturas moderadas. Las especies resisten heladas, especialmente en la etapa vegetativa del desarrollo, y no presentan susceptibilidad a daño por enfriamiento.

Dentro del género de las *Brassicaceae* se encuentra el brócoli (*Brassica oleracea* L. *Italica*) y los repollitos de Bruselas (*Brassica oleracea* L. *Gemmifera*). Numerosos estudios epidemiológicos documentan sobre la prevención de diferentes tipos de cáncer (mama, pulmón, próstata, gástrico entre otros) asociados al consumo de brócoli (Bosetti y col., 2012; Kim y Park, 2009), esto se debe al contenido de compuestos antioxidantes ya mencionados como los glucosinolatos, polifenoles, vitaminas y carotenoides.

Los glucosinolatos (Fig.1-1) son un grupo de metabolitos secundarios que se encuentran en las plantas, caracterizándose por contener el anión β -D-tioglucofuranosa. Los metabolitos secundarios juegan un rol importante para el sistema de defensa en plantas. Estos compuestos comprenden alrededor de 120 estructuras químicas que se diferencian en el sustituyente que acompañan al anión β -D-tioglucofuranosa (Halkier y Gershenzon, 2006). Dentro de la familia de las *Brassicaceae* y concretamente en la especie *oleracea* algunos de los glucosinolatos que se encuentran son la glucorafanina, glucoerucina, glucobrasicina, neo-glucobrasicina y 4-hidroxiglucobrassicina (Fahey y col., 2001).

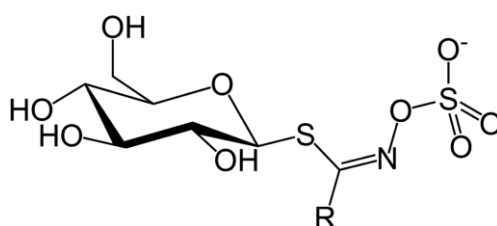


Fig. 1-1 Estructura de los glucosinolatos, el radical (R) varía según el compuesto

Los glucosinolatos intervienen en los mecanismos de defensa de la planta contra insectos, hongos, nematodos, bacterias y virus (Fahey y col., 2001). Al generarse una disrupción de la planta por masticación o corte se produce la liberación de la enzima tioglucosidasa también llamada mirosinasa (Fig.1-2), la cual en condiciones fisiológicas normales se encuentra segmentada o encapsulada dentro de la célula. Los glucosinolatos sufren una hidrólisis en presencia de mirosinasa siendo los productos glucosa, ácido sulfúrico y sustancias biológicamente activas como los isotiocianatos y compuestos que contienen el grupo indol (Campas-Baypoli y col., 2009; Halkier y Gershenzon, 2006), entre otros. Se ha comprobado que los compuestos activos derivados de esta hidrólisis tienen alta actividad anticancerígena (Kuroiwa y col., 2006); dentro de los más estudiados está el sulforafano. El sulforafano es un isotiocianato con propiedades antimicrobianas y anticarcinogénicas. En la actualidad varios laboratorios comercializan el sulforafano como un fitofármaco. En el procesamiento térmico de crucíferas como el brócoli, la disponibilidad del sulforafano depende de las condiciones operativas del proceso como la temperatura del medio y el tamaño del vegetal (Rungapamestry y col., 2007).

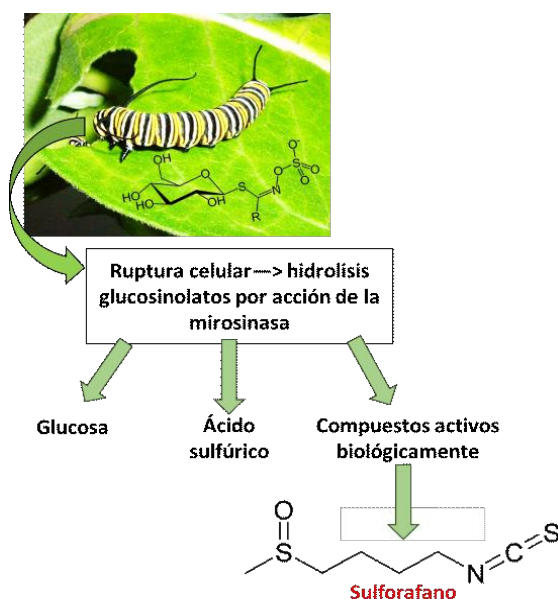


Fig. 1-2 Esquema generación de sulforafano en la naturaleza por hidrólisis de glucosinolatos

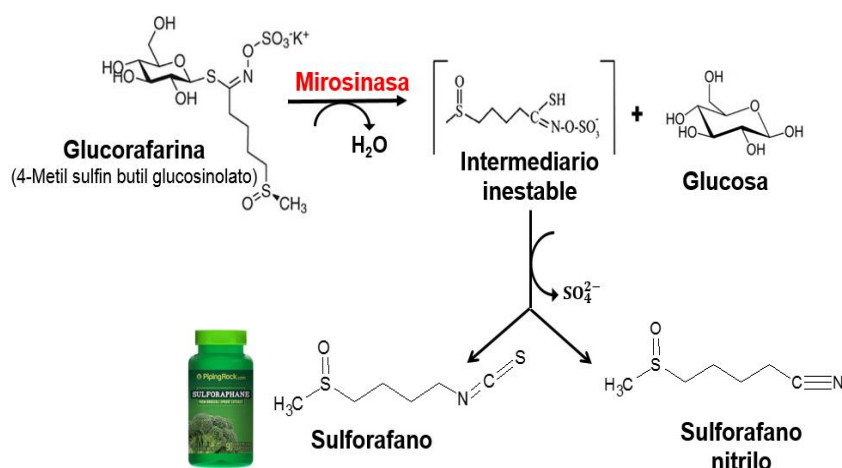


Fig. 1-3 Acción enzimática de la mirosinasa generando hidrólisis de la glucorafarina, como productos se obtiene glucosa y sulforafano

Como se mencionó anteriormente la síntesis del sulforafano se favorece en condiciones donde existe daño mecánico liberando a la mirosinasa que se encuentra segregada. La reacción de hidrólisis ocurre cuando existe una acción mecánica o térmica que favorece la disponibilidad de mirosinasa en contacto con glucorafarina. Pérez y col., (2015) optimizaron las condiciones de pre-cocción encontrando cuales eran las combinaciones de tiempo y temperatura que maximizan la actividad de mirosinasa y por ende la obtención de sulforafano. En extractos de brócoli se determinó que las condiciones térmicas de procesamiento que maximizaron la disponibilidad de la mirosinasa y el contenido de sulforafano fueron 57°C y 13

minutos (Pérez y col., 2015). En estas condiciones se aumentó un 237% en el contenido de sulforafano con respecto al vegetal fresco; cabe destacar que estos resultados se reportaron con extractos de brócoli sin tener en cuenta el perfil de temperaturas de acuerdo a la geometría y dimensión del vegetal real, por ende estos resultados comprueban la importancia de optimizar los tiempos del procesamiento térmico en condiciones industriales.

Varios estudios han demostrado que para inflorescencias de brócoli el contenido total de glucosinolatos después del procesamiento industrial (pre-cocción y congelación) no presenta diferencias significativas con respecto al vegetal fresco (González-Hidalgo y col., 2018; Rodrigues y Rosa, 1999; Verkerk, Dekker, y Jongen, 2001) siendo estos compuestos resistentes a las diferentes operaciones de procesamiento, lo cual es una ventaja en términos de calidad nutricional para la obtención de vegetales pre-cocidos congelados.

Además de los glucosinolatos, estos vegetales contienen una buena fuente de antioxidantes como polifenoles (Posdedek, 2007), vitamina C, β -caroteno, luteína y D-L- α -tocoferol (Bernhardt y Schlich, 2006). El ácido ascórbico se caracteriza por ser un potente antioxidante que participa en muchas funciones bioquímicas como: la absorción de hierro, la síntesis de colágeno y hormonas (cofactor enzimático) y neutralizador de radicales libres previniendo el envejecimiento celular, la formación de cataratas, aterosclerosis, cáncer y enfermedades cardiovasculares (Nováková y col., 2008; Russell, 2000).

Este compuesto es altamente termo-sensible e hidrosoluble, por tal motivo es importante optimizar los procesos de pre-cocción por inmersión en agua de estas especies vegetales de manera tal que se maximice la retención del ácido ascórbico.

1.2. GENERALIDADES DE LOS VEGETALES ESTUDIADOS

1.2.1. Brócoli (*Brassica oleracea* L. *italica*)

El brócoli es un vegetal estacional especialmente de otoño-invierno. No existen cifras oficiales de la producción mundial de brócoli ya que éste se agrupa junto al coliflor dentro de los datos de la Dirección de Estadística de la FAO (FAOSTAT).

Entre estos dos vegetales la producción media mundial para el 2014 fue de 24 millones de toneladas, siendo China el mayor productor con una participación en el mercado de 9 millones de toneladas (FAOSTAT, 2014). El brócoli es cultivado

desde la época romana en el mediterráneo y se introdujo en Inglaterra alrededor de 1720, todavía en estas regiones es posible encontrarlo en forma silvestre.

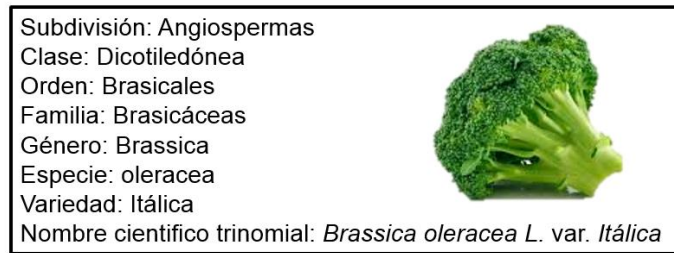


Fig. 1-4 Clasificación taxonómica del Brócoli

El tamaño de la planta desarrollada es aproximadamente de 60 cm con un tallo principal de 3 a 6 cm de diámetro, sobre él se disponen las hojas en forma helicoidal. Las hojas son de tamaño grande, pueden llegar a tener hasta 50 cm de longitud y 30 cm de ancho. El tallo principal termina en la inflorescencia primaria; que se aprovecha para el consumo humano estando en etapa inmadura. El brócoli por ser originario de una región sub-húmeda templada, está adaptado para funcionar óptimamente en condiciones de temperaturas moderadas, con agua fácilmente disponible, humedad relativa media a alta y luminosidad moderada. La planta tolera heladas suaves, pero al estar la inflorescencia presente se produce congelación y posterior pudrición de flores. (Krarup y Moreira, 1998).

El órgano de consumo del brócoli corresponde a la inflorescencia que se desarrolla a partir de la yema apical del tallo principal. Su color verde se debe a los sépalos que encierran la flor inmadura, la cual se asienta sobre un pedicelo insertado sobre el pedúnculo terciario; que a su vez se disponen sobre pedúnculos suculentos. Estos elementos corresponden fisiológica y morfológicamente a estadios florales iniciales.

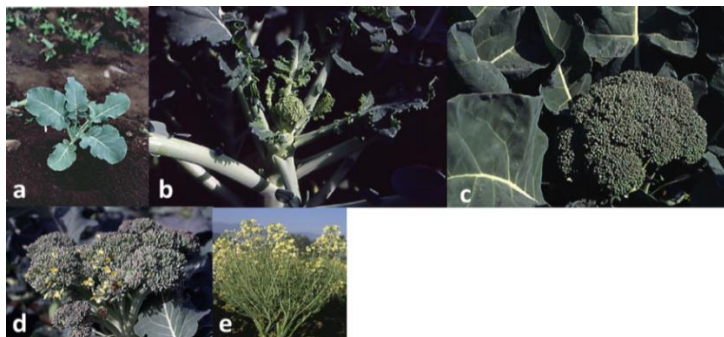


Fig. 1-5 Diferentes etapas en el desarrollo de la planta de brócoli: a) Planta a inicio del crecimiento. b) Planta al inicio de la formación de inflorescencia. c) Planta con inflorescencia óptima de cosecha. d) Inflorescencia iniciando apertura de flores e) Planta en floración y formación de silicuas

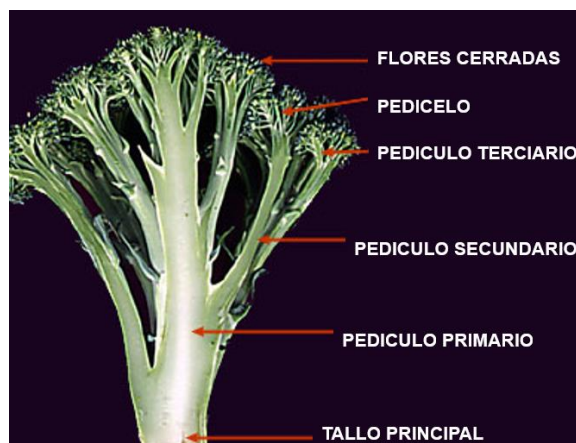
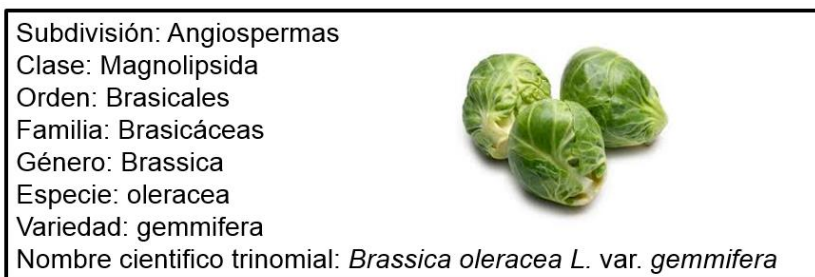


Fig. 1-6 Esquema de las partes comestibles de una inflorescencia de brócoli donde se observa la ubicación de las flores, sus sépalos, pedicelos y pedúnculos.

1.2.2. Repollito de bruselas (*Brassica oleracea* L. *gemmifera*)

Los repollitos de Bruselas son una variedad relativamente moderna de *Brassica oleracea*. Descripciones confiables de la misma sólo aparecen a comienzos del siglo XIX. Algunos autores del siglo XVI hicieron mención a un tipo con brotes axilares compactos, sin embargo, pareciera ser que se trataría de plantas de repollo cuyo punto de crecimiento fue removido. El origen exacto del repollito de Bruselas es desconocido, pero derivaría de otra *Brassica*; el repollo del saboya (*Brassica oleracea* L. *sabauda*). Se hizo más extensamente conocido en el norte de Francia y principalmente en Bélgica, lo que explicaría su nombre, que hace referencia a la capital de dicho país. Hoy es cultivado predominantemente en países europeos, particularmente Inglaterra, donde es uno de los vegetales más cultivados.



Subdivisión: Angiospermas
Clase: Magnolipsida
Orden: Brassicales
Familia: Brasicáceas
Género: Brassica
Especie: oleracea
Variedad: gemmifera
Nombre científico trinomial: *Brassica oleracea* L. var. *gemmifera*

Fig. 1-7 Clasificación taxonómica del repollito de Bruselas

Repollito de Bruselas es una planta bienal. Su tallo es erecto, no ramificado, de 70 a 80 cm altura y termina en una roseta de hojas, siendo la planta más alta de la especie. A lo largo del tallo presenta hojas de unos 40 cm de largo por 25 cm de ancho y largamente pecioladas. A medida que la planta y los brotes axilares se

desarrollan, las hojas se tornan amarillas y se desprenden del tallo. Inicialmente en su desarrollo la planta sólo produce hojas.

Una vez formadas un número determinado de hojas, se inicia la brotación de las yemas axilares, desde abajo hacia arriba, desarrollándose en lugar de ramas pequeñas cabezas que semejan un repollo diminuto de 2 a 4 cm de diámetro. Inicialmente sólo se forman cabezas apretadas, las que luego se abren perdiendo su forma y grado de compactación.

La floración ocurre en la segunda temporada de crecimiento. Para que la planta responda al estímulo vernalizante (cantidad mínima de horas de frío requeridas) es necesario que haya alcanzado cierto desarrollo. Las flores son amarillas y se ordenan en racimos alargados. Tras la fecundación se desarrolla la silicua (fruto que contiene las semillas, muy típico de las crucíferas), que en esta variedad es de 7 a 8 cm de largo, con varias semillas redondas.

Los brotes desarrollados a partir de las yemas axilares son semejantes morfológicamente al repollo común. Están constituidos por un tallo corto y engrosado, que sostiene un gran número de hojas pecioladas, dispuestas una sobre otra, donde las hojas exteriores cubren y protegen la yema terminal y las hojas más jóvenes. Desde el punto de vista cualitativo, el repollito debe ser compacto, de color verde intenso y de un tamaño cercano a 3 cm de largo y 2 cm de ancho (Krarup y Moreira, 1998).

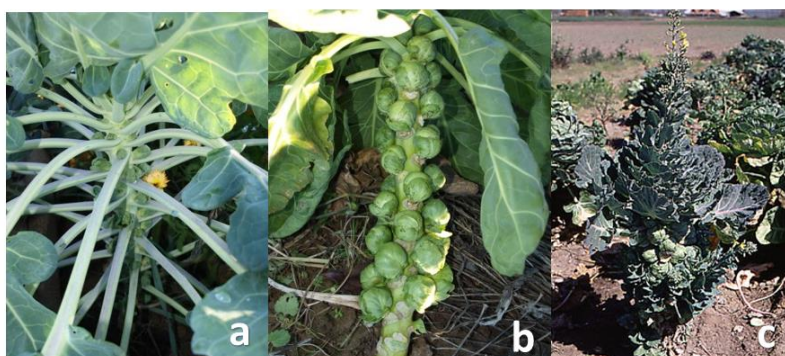


Fig. 1-8 Diferentes etapas en el desarrollo de la plata de repollito de Bruselas: a) Planta iniciando formación de repollitos axilares. b) Repollitos en óptima madurez de cosecha. c) Repollitos sobremaduros e inicio de la floración

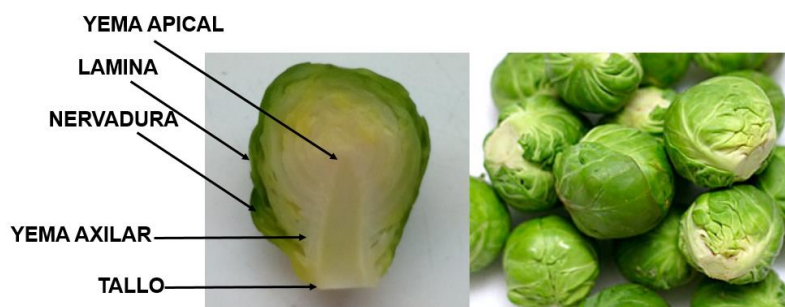


Fig. 1-9 Esquema de las diferentes partes comestibles del repollito de Bruselas

1.2.3. Cultivo y comercialización

Según el ranking de consumo de *Brassicas*, en Europa el repollito de Bruselas ocupa el quinto lugar, antecedido por repollo, repollo de Milán, Coliflor y repollo morado (Linares, 2011). En Argentina no se tienen datos sobre el consumo y producción de este vegetal a nivel local, pero en el Informe del sector de Alimentos Industrializados (hortalizas y legumbres) del año 2009 provisto por el Ministerio de Relaciones Exteriores, Comercio Internacional y Culto, se ha comunicado que en el 2008 se exportaron \$50 millones de dolares en legumbres y hortalizas de los cuales \$100 mil provenían de la venta de repollitos de Bruselas.

Se resalta que existe normativa específica para la industrialización y comercialización de repollitos de Bruselas debido a que hay un protocolo de calidad con código SAA023 y Resolución 324/2010 emitida por el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, en el cual se encuentran direccionamientos para el cultivo, cosecha y comercialización de este producto vegetal.

1.2.4. Alimentos congelados listos para consumir

En la mayoría de las grandes ciudades el estilo de vida ha cambiado; contextos urbanos cada vez más globalizados han hecho que los hábitos alimenticios se modifiquen. Es frecuente encontrar en los supermercados artículos listos para el consumo “Ready to eat” o listo para cocinar “Ready to cook”. Dentro de este tipo de alimentos los vegetales mínimamente procesados o los vegetales pre-cocidos congelados (Abadias, Usall, Anguera, Solsona, y Viñas, 2008; Maffei, Alvarenga, Sant’Ana, y Franco, 2016) presentan un aumento significativo en su consumo.

Este incremento generó grandes incrementos al segmento de alimentos congelados en los últimos años (Danesi y Bordoni, 2008; Mazzeo y col., 2011). La Fig. 1-10

muestra una visión global de los valores del comercio mundial vegetales congelados.

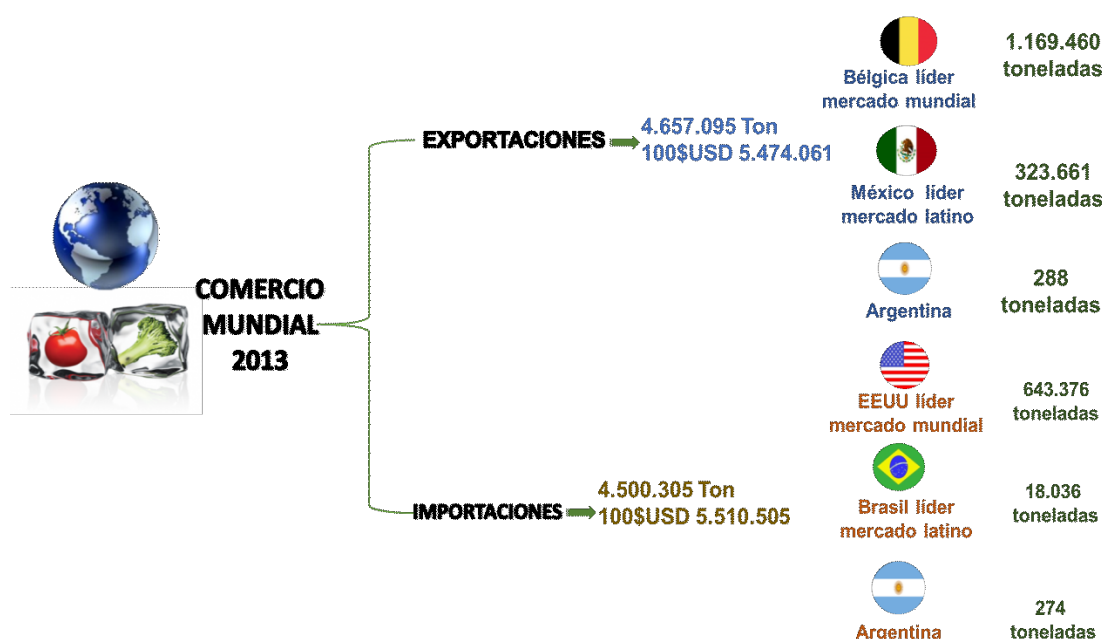


Fig. 1-10 Datos del comercio mundial de vegetales congelados según cifras oficiales para el 2013, fuente: Página oficial de la Dirección de estadística de la FAO (FAOSAT, 2014)

La congelación es una de las técnicas de conservación más utilizados para la preservación de vegetales los cuales son altamente perecederos y estacionales propios de la naturaleza del cultivo. A temperaturas bajas (-18 °C) existe una velocidad más lenta de deterioro. La ventaja radica en que la actividad de los microorganismos y de las enzimas de los alimentos se ve disminuida, con el consiguiente retraso en la degradación de sus componentes; en consecuencia los alimentos presentan una mayor vida útil (Mazzeo y col., 2015). Es importante resaltar que esta operación no es suficiente para detener totalmente las reacciones enzimáticas y la senescencia, por esta razón es necesario aplicar un tratamiento térmico previo (Canet y col., 2004) que además produce una disminución de los recuentos microbianos.

En los vegetales el tratamiento térmico es necesario y fundamental como un proceso previo a la congelación, con el fin de inactivar las enzimas responsables de su deterioro. Después de este tratamiento térmico los vegetales se congelan y se conservan a una temperatura constante, normalmente por debajo de 0°C (Aires, 2015). La combinación de estas dos operaciones para obtener brócoli y repollitos de Bruselas pre-cocidos congelados no causa una disminución en compuestos benéficos (Bernhardt y Schlich, 2006; Czarniecka-Skubina, 2002). Por el contrario cuando se procesan adecuadamente la aplicación de un tratamiento térmico seguido

de una congelación constituye una manera eficaz de preservar compuestos importantes para salud humana pudiendo retardar o detener la actividad enzimática asociada a cambios no deseables en la composición química, el sabor y la textura del producto (Aires, 2015).

En Argentina el Código Alimentario define la producción de vegetales congelados con la denominación de hortalizas congeladas a toda planta herbácea producida en la huerta, de la que una o más partes puede utilizarse como alimento en su forma natural.

La congelación, por su parte, es aquella operación en que la temperatura del alimento se reduce para lograr que una proporción elevada del agua que contiene, cambie de estado formando cristales de hielo. Los principales vegetales que se comercializan en el mercado local como alimentos pre-cocidos congelados son acelga, arvejas, brócoli, chauchas, cebolla picada, choclo y espinaca, zanahorias y espárragos. Son comunes también las mezclas de vegetales que se comercializan como: ensalada jardinera, ensalada primavera, mix de vegetales y mix de vegetales y pollo.

1.2.5. Problemática del sector de vegetales pre-cocidos congelados

Como se ha mencionado los alimentos pre-cocidos congelados son productos que presentan beneficios nutricionales, por tal motivo su producción y consumo a nivel mundial genera gran flujo comercial. Por otra parte en economías de expansión y crecimiento como la Argentina, el mercado de este tipo de productos no ha tenido mucho desarrollo, principalmente porque los costos de producción y la conservación en góndola son altos elevando el precio final de venta.



Fig. 1-11 Repollitos (Coles) de Bruselas pre-cocidos congelados vendidos en España producidos por la empresa Alipende.

Según una nota de Alfredo Sainz (2017) publicada por el diario La Nación existe en el país una manufactura de alimentos congelados que data desde finales de la década del 70. Dicha actividad local aunque tiene transcendencia muestra un nivel

comercial muy por debajo de los estándares internacionales. En Argentina la adquisición de alimentos congelados por persona es de 1.8 kg/año; este valor es bajo si se compara con España (19 Kg/año) o Estados Unidos (36 kg/año).

Estudios de mercado hechos por Kantar World Panel el nicho de demanda se concentra en poblaciones socio económicas medias altas debido a los altos costos. Cifras publicadas por el INDEC del 2016 muestran que tan solo el 28% de la población argentina tienen ingresos correspondientes a la clase media típica y el 17 % a la clase media alta, esto genera que la participación del mercado sea reducida ya que el poder adquisitivo de la población promedio no permite que estos productos sean accesibles para su consumo diario.

En el país existe una escasa variedad de estos productos, los vegetales comúnmente consumidos son la acelga, arveja o brócoli. Por otra parte aunque es amplio el cultivo repollitos de Bruselas, no se encuentra comercializado como vegetal pre-cocido congelado a diferencia de otros países como España o Uruguay. Resulta importante desde el punto de vista ingenieril aportar conocimiento para el adecuado procesamiento y elaboración de vegetales pre-cocidos congelados; en especial de hortalizas como el repollito de Bruselas, que tiene alto potencial para la exportación mundial y consumo interno.

1.2.6. Generalidades del procesamiento térmico en vegetales

El tratamiento térmico de vegetales puede lograrse mediante una variedad de técnicas utilizando agua caliente o vapor (cocción, escaldado, pasteurización, esterilización, evaporación), aire caliente (secado) y energía irradiada (microondas, radiación infrarroja y radiación ionizante) (Ramaswamy y Chen, 2002). En el caso de procesamiento de vegetales congelados utilizaremos el término “pre-cocción” definiéndolo como una etapa previa a la congelación cuyo objetivo es doble. Por un lado, se debe lograr la inactivación enzimática para evitar deterioro (escaldado), y segundo asegurar que el tratamiento térmico logre un producto de calidad (color, textura, etc.) adecuado para consumir luego de su descongelación y calentamiento.

El tratamiento térmico del producto se puede realizar por inmersión en agua o mediante vapor de agua. Comparando la pre-cocción en agua con el de vapor, el primero tiene un menor costo de capital y una mayor eficiencia energética pero se obtienen grandes pérdidas de componentes solubles en agua, incluyendo vitaminas, minerales y azúcares, además se producen mayores volúmenes de efluentes los

cuales son susceptibles a la contaminación bacterias termófilas (Gökmen, 2010; Williams y col.,1986). La investigación en ingeniería de alimentos en este tema conduce al desarrollo de una operación más eficiente mejorando los equipos, un ejemplo es la recirculación de agua caliente para mejorar la retención de nutrientes, reducir las pérdidas por lixiviación y mejorar eficiencia energética (Cumming y col., 1985).

Otros procedimientos de pre-cocción no convencionales utilizan gas caliente hidratado, microondas o técnicas de calentamiento óhmico. El tiempo de pre-cocción (10 s a 15 min) depende del tipo y el tamaño del vegetal, el tipo de proceso (agua, vapor, gas caliente o microondas) y de la temperatura a la cual se realiza el proceso.

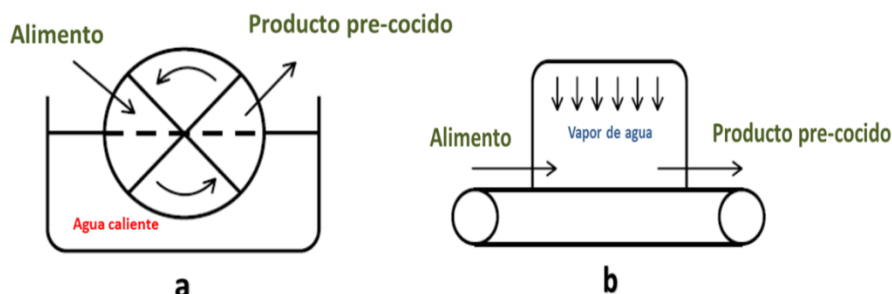


Fig. 1-12 Esquema del principio de funcionamiento del proceso de pre-cocción: a) inmersión en agua caliente. b) vapor de agua (Gökmen, 2010)

Luego del tratamiento térmico para inactivar enzimas los vegetales deben someterse a un proceso de enfriamiento rápido para minimizar la pérdida excesiva de nutrientes y evitar la proliferación de microorganismos. Asimismo, esta etapa es fundamental para minimizar los consumos de energía durante el proceso de congelación; en general en la industria se utilizan tanques de acero inoxidable conteniendo una mezcla de agua-hielo. Previo a la entrada al congelador se deja drenar el exceso de agua del vegetal.

La congelación es una de las operaciones más usadas en las plantas de procesamiento vegetal debido a que mantiene la calidad nutricional y sensorial del producto (Gökmen, 2010). En los vegetales el agua es el componente que se encuentra en mayor proporción, por ende, cuando la temperatura desciende por debajo de 0°C comienza la formación de hielo.

El vegetal congelado se puede considerar formado por cristales de hielo, una solución acuosa conteniendo componentes solubles y una matriz sólida. A medida

que avanza la congelación del alimento la solución en equilibrio se encuentra más concentrada en solutos disminuyendo la temperatura de equilibrio a lo largo de la congelación.

El proceso de congelación entonces ocurre en un rango de temperaturas y no a una temperatura única como en el caso del agua pura.

El análisis del proceso de transferencia de energía en la congelación es un proceso complejo con cambio de fase, en el que las propiedades termofísicas varían fuertemente con la temperatura a través de los cambios de fracción de agua congelada.

1.2.7. Enzimas en el procesamiento de vegetales

Los vegetales contienen una amplia variedad de enzimas que intervienen en el desarrollo metabólico, por lo tanto es importante conocer la actividad enzimática ya que puede provocar cambios en el color, sabor, aroma, textura, y calidad nutricional. Después de la madurez, muchas enzimas continúan activas que sumado a los deterioros por manipulación en la recolección y almacenamiento acelera la senescencia del tejido (Gökmen, 2010; Velasco, Lim, Pangborn, y Whitaker, 1989). Hay una serie de enzimas responsables en el deterioro de la calidad de los vegetales (Tabla 1-1).

Los deterioros presentados por la acción de las enzimas generan principalmente dos tipos de alteraciones:

- ✓ Cambios sensoriales: Cambio en la textura, decoloración, pardeamiento y el desarrollo de mal sabor y olor son los resultados de la actividad enzimática. Ejemplos son las enzimas lipolíticas y proteolíticas que causan desarrollo de mal sabor, enzimas pectinolíticas que junto con celulasas son las principales responsables en los cambios de textura. Polifenoloxidasas, peroxidasas y clorofilasas causan cambios en el color.
- ✓ Cambios nutricionales: pérdida de vitaminas como el ácido ascórbico el cual es degradado por el ácido ascórbico oxidasa; la pérdida de compuestos bioactivos como compuestos fenólicos y carotenoides. Dentro de los compuestos fenólicos se encuentran los polifenoles éstos son importantes como antioxidantes naturales, por lo tanto su oxidación por la acción de la

polifenoloxidasa genera una pérdida nutricional (Altunkaya y Gökmen, 2008). Los carotenoides son también otro grupo de antioxidantes lipofílicos originados en las plantas afectados por la lipoxigenasa, enzima que oxida a compuestos que contienen fracciones cis,cis-1,4-pentadienos (Altunkaya y Gökmen, 2008).

Tabla 1-1 Tipos de deterioros asociados a enzimas que lo producen

	TIPO DE DETERIORO	ENZIMA RESPONSABLE
Sensorial	Desarrollo de mal sabor y/o olor	Lipoxigenasa Proteasas Lipasas
	Cambios de Textura	Pectinasa Celulasa
	Cambio de color	Polifenoloxidasa Clorofilasa Peroxidasa Lipoxigenasa (Acción secundaria)
Nutricionales	Pérdida de vitaminas, Antioxidantes y fitoquímicos	Ácido ascórbico oxidasa Tiaminasa Polifenoloxidasa Lipoxigenasa (Acción secundaria)

Es importante establecer cuál es la principal enzima que provoca el deterioro en el vegetal y la correspondiente cinética de inactivación (Williams y col., 1986), muchos de los cambios sensoriales y de calidad en los vegetales congelados están directamente relacionados con la actividad enzimática. Basándose en el tipo de deterioro y enzima responsable en la presente Tesis se seleccionaron la peroxidasa (POD) y lipoxigenasa (LOX); ambas enzimas pertenecen al grupo óxido-reductasas (Müftügil, 1985) las cuales son responsables de la oxidación de muchos compuestos.

La POD actúa en presencia de peróxido de hidrógeno y oxígeno libre (Lagrimini, Vaughn, Erb, y Miller, 1993). Esta enzima se encuentra en la mayoría de los vegetales (Burnette, 1977) y dada su gran estabilidad térmica se la emplea frecuentemente como parámetro indicador de la finalización del proceso de inactivación enzimática además de la factibilidad de detección durante el proceso térmico (Schwimmer, 1981). El Departamento de Agricultura de los Estados Unidos

(USDA) utiliza la POD para monitorear los procesos de inactivación y así minimizar los cambios de calidad en el almacenamiento de los vegetales. A la POD se le atribuyen cambios indeseables en el color ya que produce compuestos de color pardo. Aunque la polifenoloxidasas (PPO) también genera una coloración parda por el contacto del oxígeno atmosférico con los compuestos fenólicos (Adams, 2010), esta enzima está asociada a operaciones de manipulación mecánica como en el cortado. En el caso de pre-tratamiento térmico y congelación de crucíferas estudiados en la presente Tesis donde se procesa el vegetal entero, no se implementan etapas de cortado con presencia de daños mecánicos donde pueda intervenir la PPO.

Para un tratamiento térmico óptimo, evitando un excesivo calentamiento se ha recomendado una concentración residual de POD de 7.5-11% en repollitos de Bruselas (Williams y col., 1986); sin embargo esto se ha reportado sin reconocer la geometría real del vegetal ya que los ensayos fueron realizados en extractos del vegetal.

A la enzima LOX se le atribuyen cambios en el sabor y aroma (Williams y col., 1986); esto se debe a las modificaciones oxidativas de los ácidos grasos poliinsaturados con estructura cis, cis-1,4-pentadieno en las plantas superiores. Los sustratos específicos para lipoxigenasa son ácidos grasos como el ácido linoleico y linolénico (Galliard y Chan, 1980). En los vegetales, esta enzima no se encuentra exclusivamente en un órgano (Galliard y Chan, 1980). La existencia de la enzima se registra en raíces, cotiledones, hipocotíleos, flores y hojas dentro de una misma planta (Pinsky, Grossman, y Trop, 1971), sin embargo generalmente está coligada a cloroplastos, mitocondrias y habitualmente a citoplasma (Vernooy-Gerritsen, Bos, Veldink, y Vliegenthart, 1983).

En crucíferas, específicamente Brócoli la inactivación térmica enzimática de POD y LOX evidenció un comportamiento bifásico de inactivación (Anese y Sovrano, 2006; Anthon y Barrett, 2003; Gonçalves y col., 2009; Güneş y Bayindirli, 1993; Lin y col., 2012; Morales-Blancas, Chandia, y Cisneros-Zevallos, 2002; Saraiva, Oliveira, Lemos, y Hendrickx, 1996; Soysal y Söylemez, 2005; Thongsook y Barrett, 2005). Esto demuestra la presencia de una fracción termolábil y una termo resistente de una misma enzima por lo cual el comportamiento de cada fracción térmicamente diferente puede ser modelada para obtener parámetros cinéticos característicos. De acuerdo a la literatura se ha reportado que cada fracción obedece a una cinética de inactivación térmica de primer orden (Ling y Lund, 1978).

En la presente Tesis se estudiarán las cinéticas de inactivación térmica de Brócoli para analizar su comportamiento en vegetales cultivados en la zona de La Plata. En cuanto a repollitos de Bruselas se desconoce si existen distintos tipos de enzimas con distinta estabilidad térmica, y la existencia de literatura referente a cinéticas y energías de inactivación enzimática es limitada.

1.2.8. Optimización industrial del procesamiento de vegetales precocidos congelados

Para obtener un producto "Ready to Cook" (RTC) se requieren de varias etapas de procesamiento, principalmente una etapa donde existe un tratamiento térmico seguido de un enfriamiento y congelación. Estas etapas se pueden describir mediante fenómenos de transferencia de energía y requieren de la resolución matemática de las ecuaciones diferenciales a derivadas parciales con condiciones iniciales y de contorno específicas.

El modelado matemático de procesos en ingeniería de alimentos implica resolver en una gran mayoría de los casos, la ecuación de conducción de calor (Carslaw y Jaeger, 1959):

$$\rho C_p \frac{\partial T}{\partial t} = \nabla \cdot (k \nabla T) \quad (1-1)$$

siendo ρ la densidad, C_p calor específico, k conductividad térmica, T la temperatura, y t el tiempo. Las soluciones analíticas a dicha ecuación existen para geometrías de forma regular como esferas, cilindros finitos o infinitos, placas planas y paralelepípedos y fueron ampliamente utilizadas en procesos de transferencia de calor (Singh y Heldman, 1981) y aplicados por analogía a transferencia de materia (Rodríguez y Zaritzky, 1986). En la actualidad se utilizan en muchos casos para obtener propiedades térmicas de alimentos (Erdogdu, 2005). Las soluciones analíticas de las ecuaciones diferenciales a derivadas parciales, son útiles pero resultan insuficientes cuando se requiere el conocimiento cuantitativo en sistemas complejos, donde por ejemplo las propiedades termofísicas no se mantienen constantes, o cuando las geometrías son irregulares. Los modelos numéricos, por ejemplo las diferencias finitas, el método de la grilla ajustada a los contornos, y los elementos finitos son más adecuados para resolver dichos problemas (Phcam, 2006,

2008; Califano y Zaritzky, 1993, 1997).

La simulación computacional aplicada a procesos de transferencia de calor y materia en alimentos es una herramienta fundamental para el desarrollo de nuevas tecnologías y metodologías de trabajo a lo largo de toda la cadena de elaboración de productos. La principal ventaja radica en la reducción de tiempos y costos respecto a la realización de experimentos con prototipos en escala industrial, que requieren de personal entrenado para su correcta ejecución. La simulación computacional también aporta información valiosa para empresas del sector productivo alimenticio que se encuentran en una etapa de adquisición de equipos de gran envergadura (congeladores, cámaras de refrigeración, etc.), ya que permite conocer los tiempos de proceso y comparar entre distintos modelos y diseños (Martins, 2006).

Los métodos experimentales de predicción realizados en plantas de producción industrial están acotados por el número de parámetros que pueden modificarse, limitando la evaluación de las condiciones que permiten optimizar el procesamiento del alimento (rangos de temperatura del medio refrigerante, coeficiente transferencia de calor en la interfase, etc.). La simulación computacional aporta información detallada, tanto en función del tiempo como de las coordenadas espaciales. Sin embargo hay que tener en cuenta que la simulación numérica resulta útil siempre y cuando el modelo haya sido validado experimentalmente, alimentado al código computacional propiedades termofísicas y coeficientes de transferencia de interfase determinados previamente, ya sea en forma experimental o a partir de correlaciones de literatura. La industria alimenticia requiere conocer y resolver problemas de optimización y control de sus procesos. Existe una creciente tendencia en obtener productos semi o totalmente elaborados (alimentos RTC).

Normalmente los alimentos pre-elaborados no tienen geometrías regulares (como esferas, cubos, placas planas, etc.) sino que presentan diversas formas geométricas, frecuentemente irregulares. Resolver las problemáticas industriales teniendo en cuenta la geometría irregular del producto ayuda a que los resultados obtenidos se ajusten a la realidad. El método de los elementos finitos (MEF) es el más adecuado para encarar los problemas de interés del sector, dada su capacidad para resolver problemas cuya geometría no puede asimilarse a una geometría regular.

El MEF es un método numérico especialmente útil para resolver problemas de transferencia de calor en geometrías irregulares, ya que permite que los elementos

de interpolación se ajusten a contornos curvilíneos complejos. Para la optimización del procesamiento integral de vegetales pre-cocidos congelados, se deben acoplar a estos modelos matemáticos de transferencia de energía (calentamiento y enfriamiento), las cinéticas de inactivación enzimática en cada punto y región del alimento; es decir hay que incorporar al modelo las constantes cinéticas y energías de activación de las enzimas POD y LOX tanto de sus fracciones termo-lábiles como termo-resistentes. El análisis del proceso de transferencia de energía en la congelación es un proceso complejo con cambio de fase en el que las propiedades termofísicas varían fuertemente con la temperatura a través de los cambios de fracción de agua congelada (Fig. 1-13). Las abruptas variaciones de las propiedades termofísicas alrededor del rango de temperaturas del cambio de fase generan que el planteo matemático del sistema sea altamente no-lineal.

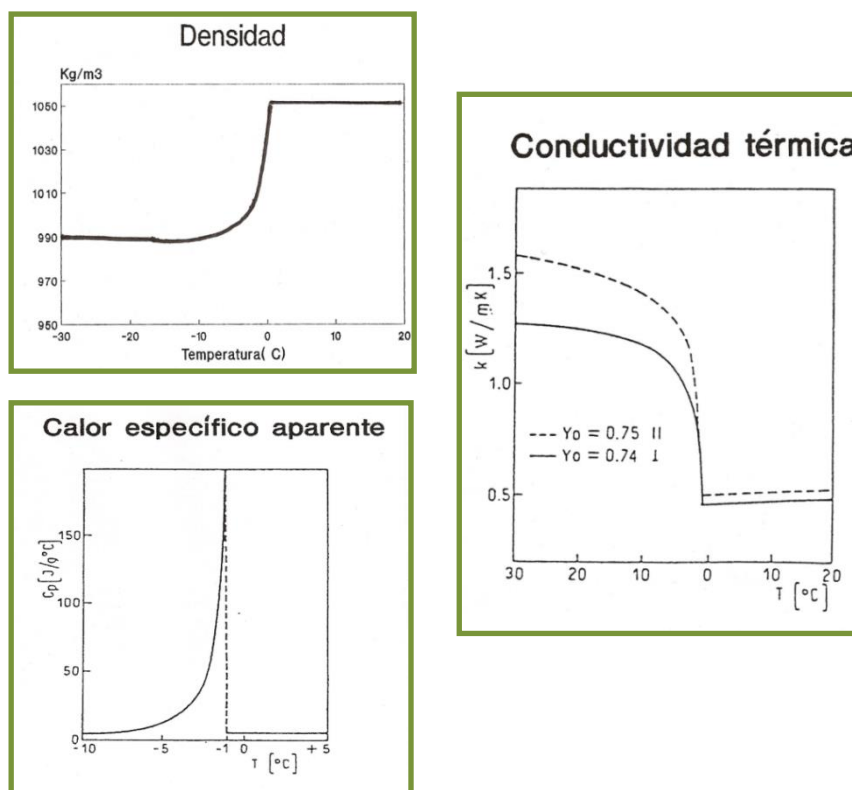


Fig. 1-13 Curvas típicas para mostrar la funcionalidad de las propiedades termofísicas vs temperatura durante un proceso de congelación (Santos,2010)

1.3. OBJETIVOS

En la presente tesis el objetivo principal fue optimizar el proceso de obtención de un vegetal pre-cocido congelado con el fin de establecer tiempos óptimos de precocción que alcancen porcentajes de actividad enzimática residual aceptables para su conservación en forma congelada, manteniendo sus propiedades organolépticas y

nutricionales. En este sentido es necesario determinar experimentalmente las curvas de inactivación enzimática de lipoxigenasa (LOX) y peroxidasa (POD) en vegetales de la familia *Brassicacea*. A partir de estas curvas se calcularán los parámetros cinéticos de inactivación enzimática durante la pre-cocción en agua; estos parámetros permiten el correcto diseño de los tiempos de proceso.

Para realizar la simulación computacional del procesamiento industrial de vegetales, que incluye el tratamiento térmico, enfriamiento y congelación, se seleccionó trabajar a lo largo de esta Tesis con repollito de Bruselas, ya que siendo escasa la información reportada en literatura acerca de parámetros cinéticos de inactivación de LOX y POD en dicho vegetal el aporte podría ser significativo.

Asimismo la comercialización de este vegetal en forma congelada en nuestro país es baja comparada con brocoli, lo cual permitiría realizar una contribución concreta al sector productivo mediante el conocimiento de tiempos de procesamiento óptimos.

Los parámetros cinéticos de inactivación que se obtengan para repollitos se utilizarán para optimizar el procesamiento industrial mediante la aplicación de modelos matemáticos de transferencia de energía utilizando el Método de Elementos Finitos. El procesamiento térmico para inactivar enzimas consta de una etapa de pre-cocción en agua y un posterior enfriamiento en un baño de agua-hielo. Se simulará matemáticamente el procesamiento térmico considerando ambas etapas (calentamiento y enfriamiento) y se desarrollará un programa que simula el proceso de congelación de este vegetal teniendo en cuenta su geometría y la variación de las propiedades termofísicas con la temperatura.

Por último, se estudiarán los cambios en los parámetros de calidad durante el almacenamiento congelado de repollitos de Bruselas analizando la relación que existe entre los atributos de calidad y la actividad enzimática residual para optimizar el proceso.

Los objetivos específicos de la presente tesis se describen a continuación:

A. Cinéticas de inactivación de peroxidasa (POD) y lipoxigenasa (LOX) en brócoli y repollitos de Bruselas.

- I. Determinar experimentalmente la actividad enzimática de las enzimas en función del tiempo y temperatura de proceso. Establecer si existen fracciones termolábiles y termoresistentes de una misma enzima (comportamiento

bifásico).

- II. A partir de los datos experimentales calcular los parámetros cinéticos (constantes de inactivación (k) y energías de activación (E_a)) utilizando herramientas estadísticas y regresiones no lineales.
- III. Cuantificar la composición centesimal de ambos vegetales determinando la humedad, proteína, lípidos, cenizas y carbohidratos.

B. Simulación de los pre-tratamientos térmicos en repollitos de Bruselas acoplando las cinéticas de inactivación.

- I. Simular el proceso de transferencia de energía involucrado en el pre-tratamiento térmico (calentamiento y enfriamiento) de repollitos de Bruselas considerando que el vegetal tiene una geometría bidimensional irregular axial simétrica. Determinación experimental de los coeficientes de transferencia calórica en la interfase en los sistemas estudiados durante el calentamiento en baño termostático con agitación y en un baño de enfriamiento agua-hielo. Verificar dichos coeficientes con correlaciones de literatura en base a números adimensionales como el Nusselt, Prandtl, Grashof, entre otros.
- II. Acoplar las cinéticas de inactivación enzimática de POD y LOX al programa principal de transferencia de calor para determinar los tiempos del pre-tratamiento térmico (calentamiento y enfriamiento) para alcanzar una determinada actividad enzimática residual optimizando el proceso.
- III. Validar los modelos numéricos con resultados experimentales para las distintas etapas, correlacionando los tiempos de pre-tratamiento térmico con la actividad enzimática residual de POD y LOX que permite obtener un producto vegetal apto para su congelación y almacenamiento.
- IV. Caracterizar diferentes parámetros de calidad (color, textura, contenido residual de ácido ascórbico) después del procesamiento térmico de los vegetales

C. Simulación del proceso de congelación de repollitos de Bruselas en túnel.

- I. Desarrollar un código computacional propio que simule la transferencia de calor con cambio de fase en una geometría bidimensional irregular utilizando un método que combine la formulación entálpica y de Kirchhoff.
- II. Implementar el programa para simular el problema no lineal de congelación que tenga en cuenta la variación de las propiedades termofísicas con la

temperatura.

- III. Realizar la medición de las propiedades físicas como el calor específico aparente utilizando Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) y la determinación experimental de los coeficientes de transferencia calórica en la interfase en los sistemas estudiados.
- IV. Validar las predicciones numéricas mediante resultados experimentales de historias térmicas en equipos de congelación a escala piloto.

D. Correlación de parámetros de calidad con la Actividad Enzimática durante el almacenamiento congelado.

- I. Estudiar el almacenamiento congelado de repollitos de Bruselas con distintos tiempos de pre-cocción.
- II. Analizar y correlacionar los cambios en parámetros de calidad (color, textura), contenido de ácido ascórbico y actividad enzimática residual (POD y LOX) antes y después del almacenamiento congelado.
- III. Realizar una evaluación sensorial de aceptabilidad general.
- IV. Optimizar el proceso tecnológico que permita obtener vegetales pre-cocidos congelados de alta calidad.

1.4. ESQUEMA GENERAL DE TESIS

Con el propósito de aportar información y optimizar desde el punto de vista ingenieril los tiempos de procesos (calentamiento, enfriamiento y congelación) de vegetales precocidos congelados, específicamente vegetales de la familia *Brassicácea* se propuso realizar la presente Tesis que consta de cinco capítulos.

El **primer capítulo** es una breve introducción sobre el estado del arte de la temática abordada.

En el **segundo capítulo** se aborda la determinación experimental de la composición centesimal y las cinéticas de inactivación térmica de la peroxidasa y lipoxigenasa en brócoli y repollitos de Bruselas. Para la cinética de inactivación se realizaron extractos enzimáticos de los vegetales y formulando un sustrato específico para cada enzima, se determinó la actividad enzimática residual a diferentes tiempos y temperaturas de estudio. Los resultados obtenidos experimentalmente se analizaron mediante regresiones no lineales y técnicas estadísticas obteniendo los parámetros

cinéticos como las constantes de reacción a distintas temperaturas y las energías de activación.

En el **tercer capítulo** se incorporan los datos de los parámetros cinéticos de inactivación enzimática obtenidos para los repollitos de Bruselas, para simular numéricamente el pre-tratamiento térmico que incluye el calentamiento y enfriamiento de los vegetales mediante el método de los elementos finitos. Para la simulación el modelo considera la forma geométrica real del vegetal, además de medir las propiedades termofísicas por medio de calorimetría diferencial de barrido. Se validaron los modelos con experimentos de laboratorio midiendo la historia térmica de los vegetales, determinado previamente los coeficientes de transferencia de calor del sistema en cada etapa de proceso; calentamiento y enfriamiento. Se midieron diferentes parámetros de calidad como contenido de ácido ascórbico, variación del color y textura con el fin de distinguir los cambios que el vegetal tiene después del procesamiento térmico.

En el **cuarto capítulo** se desarrolla el modelado matemático correspondiente a la etapa de congelación, para este tiene en cuenta los cambios en las propiedades termofísicas del vegetal dependientes de la temperatura, lo cual representó un problema complejo debido al cambio de fase de agua a hielo en el alimento. Se presentan los resultados de los experimentos de laboratorio en baños termostáticos y túneles de congelación obteniendo las historias térmicas que permiten validar las predicciones numéricas del modelo.

En el **quinto capítulo** se relaciona la actividad enzimática residual con los cambios en los parámetros de calidad (contenido de ácido ascórbico, variación de la textura y color) después del almacenamiento congelado en cámaras a -20°C de los vegetales que fueron sometidos a distintos tiempos de pre-tratamiento térmico; también se realizó una evaluación sensorial de aceptabilidad general para seleccionar las condiciones operativas que permiten obtener repollitos de Bruselas pre-cocidos congelados con parámetros físicos, sensoriales y nutricionales de alta calidad.

En el **sexto capítulo** se presentan las conclusiones de la Tesis.



CAPITULO 2

CINÉTICAS DE INACTIVACIÓN ENZIMÁTICA EN BRÓCOLI (*BRASSICA OLERACEA* L. *ITALICA* Y REPOLLITO DE BRUSELAS (*BRASSICA OLERACEA* L. *GEMMIFERA*)



2. CINÉTICAS DE INACTIVACIÓN ENZIMÁTICA EN BRÓCOLI (*BRASSICA OLERACEA L. ITÁLICA*) Y REPOLLITOS DE BRUSELAS (*BRASSICA OLERACEA L. GEMMIFERA*)

En el presente capítulo se determinan los parámetros cinéticos asociados a la inactivación térmica de las enzimas Peroxidasa (POD) y Lipoxigenasa (LOX), tanto para el brócoli como para repollitos de Bruselas.

2.1. OBJETIVOS DEL CAPITULO

- I. Determinar la composición centesimal del brócoli y de repollitos de Bruselas.
- II. Obtener experimentalmente las curvas de inactivación térmica enzimática (POD y LOX) de los vegetales estudiados.
- III. Identificar la presencia de isoenzimas termo-lábiles y termo-resistentes en el proceso de inactivación térmica de ambas enzimas.
- IV. Calcular a partir de las curvas de actividad enzimática residual en función del tiempo a distintas temperaturas las constantes cinéticas de inactivación y las energías de activación del proceso
- V. Aplicar técnicas estadísticas específicas y regresiones matemáticas no lineales que permitan obtener los parámetros cinéticos de inactivación de POD y LOX en ambos vegetales cuando existen fracciones de enzimas con distinta estabilidad térmica.

2.2. GENERALIDADES DE LAS ENZIMAS Y DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Las enzimas son proteínas que intervienen en la catálisis de las reacciones biológicas. Se caracterizan por su extraordinaria especificidad y su poder catalítico, (Nelson, Osgood, Cox, y Ocorr, 2004). Las enzimas estructuralmente están compuestas por L- α -aminoácidos presentando cuatro niveles estructurales de organización:

- Nivel primario: Corresponde a la unión de los diferentes α -aminoácidos a partir de enlaces peptídicos, correspondiente a las uniones entre el grupo amino con el

grupo carboxilo de dos o más aminoácidos liberando agua.

- Nivel secundario: Es la generación de conformaciones α -hélices y hoja- β -plegada por causa de interacciones como puentes de hidrógeno entre las secuencias de los aminoácidos.
- Nivel terciario: Se refiere a la estructura tridimensional de la proteína plegada la cual se genera por la presencia de puentes disulfuro, enlaces de hidrógeno, enlaces iónicos, interacciones hidrofóbicas y fuerzas de van der Waals. Estos tipos de enlaces e interacciones mantienen la conformación de la proteína además de originar los sitios activos de la estructura que corresponden a pequeños residuos de aminoácidos libres.
- Nivel cuaternario: Hace referencia a la interacción de varias subunidades proteicas mediante interacciones no covalentes (puentes de hidrógeno, interacciones

La especificidad y poder catalítico de estos bio-compuestos se caracteriza por la unión de un sustrato a un sitio activo de la enzima. Se conoce como sustrato a uno o más compuestos químicos específicos para cada enzima que habilita su actividad catalítica. La parte de la enzima donde se une el sustrato a la enzima se llama sitio activo. El sitio activo obtiene sus propiedades, como su forma y capacidad para unir sustratos, de los aminoácidos que lo componen. Estos aminoácidos pueden tener cadenas laterales de distintos tamaños, ser de naturaleza anfífila y especificad anfótera. La unión específica enzima-sustrato se explica generalmente por el modelo "Llave-Cerradura", el cual según el tipo de enzima puede llegar a ser modificado debido a la variabilidad reactiva con la cual se cataliza la reacción.

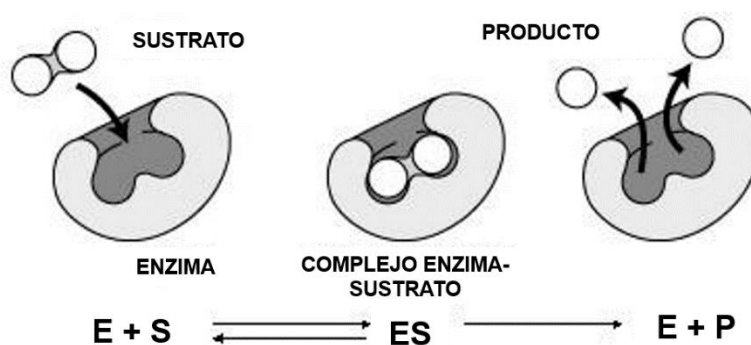


Fig. 2-1 Esquema "Llave-cerradura", ejemplificando la especificidad enzima sustrato

Muchas enzimas presentan especificidad estereoquímica ya que catalizan las reacciones específicamente para un tipo de conformación espacial. El poder catalítico aumenta mediante la energía de enlace establecida entre enzima-sustrato y la estabilización de las interacciones hidrofóbicas. Un aspecto importante de la actividad enzimática radica en la presencia de elementos o compuestos conocidos como cofactores que generan la actividad biológica de la enzima.

Existen cofactores inorgánicos y orgánicos; dentro de los orgánicos están las coenzimas y grupos prostéticos. El término coenzima se refiere específicamente a cofactores enzimáticos mientras que los grupos prostéticos pueden ser cofactores de proteínas sin actividad enzimática. Los cofactores orgánicos se diferencian de acuerdo al tipo de unión que desarrollan (débil o fuerte). Un ejemplo de coenzimas son las vitaminas B.

Cuando el cofactor se une fuertemente a la enzima por acción de enlaces covalentes genera un grupo prostético; los cofactores también pueden ser iones metálicos como Ca^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Mo^{3+} y Zn^{2+} . Una enzima sin su cofactor se denomina apoenzima por lo tanto carece del poder catalítico, en cambio una enzima con un cofactor se conoce como una holoenzima (Bayindirli, 2010).

Las enzimas se clasifican según el tipo de reacción que catalizan, cada una de estas se indican con su número EC (Enzyme Commission) el cual corresponde a un número que codifican las reacciones catalizadas. En la Tabla 2-1 se presenta la clasificación general de las enzimas.

2.2.1. Cinética enzimática

Se conoce como cinética enzimática al estudio de la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas. La cinética enzimática permite conocer mecanismos de la reacción catalítica y de la especificidad del enzima. La actividad enzimática (AE) se determina por medio de la lectura espectrofotométrica donde la transformación del sustrato involucra la absorción de luz y por ende el cambio de la absorbancia con el tiempo (Bernt y Hess, 1965).

La medición de la AE es un procedimiento experimental que generalmente no requiere purificar o aislar la enzima pero es importante tener el medio adecuado para asegurar la performance total de la enzima. Se debe tener condiciones óptimas de pH, fuerza iónica, temperatura, presencia de cofactores, y usar concentraciones saturadas de sustrato para que se desarrolle la totalidad de la reacción catalítica.

Tabla 2-1 Clasificación de las enzimas según la reacción que catalizan

EC CLASE	REACCIÓN CATALIZADA	EJEMPLO
EC 1 Oxidorreductasas	$A^- + B \leftrightarrow A + B^-$ (reducido) $A + O \rightarrow AO$ (oxidado)	Peroxidasa Catalasa Polifenoloxidasas Lipoxigenasa Ácido ascórbico oxidasa Alcohol deshidrogenasa
EC 2 Transferasas	$AB + C \leftrightarrow A + BC$	Amilosucrasa Transglutaminasa
EC 3 Hidrolasas	$AB + H_2O \leftrightarrow AOH + BH$	Invertasa Clorofilasa Amilasa Celulosa Poligalacturonasa
EC 4 Liasas	$YA-BX \leftrightarrow A=B+YX$	Pectinialiasa Fenilalanina amonioliasa Cisteína sulfóxidoliasa Hidroperóxidoliasa
EC 5 Isomerasas	$YA-BX \leftrightarrow XA-BY$	Glucosa isomerasa Carotenoide isomerasa
EC 6 Ligasas	$A+B \leftrightarrow AB$	Sintetasa Hidroxicinamato CoA Ligasa

La AE se mide en unidades de actividad enzimática (U), donde U es la unidad internacional de medida que relaciona la cantidad de enzima presente en solución con la producción de 1µmol de producto por minuto (Bayindirli, 2010); experimentalmente U se determina como el cambio de la absorbancia por unidad de tiempo (minuto). La AE se puede expresar en U por miligramo de proteína (U/mg proteína), gramo en base seca (U/g masa seca) o por mililitro de disolución (U/ml).

2.3. ENZIMAS INDICADORAS DE LA CALIDAD EN VEGETALES

2.3.1. Lipoxigenasa

La Lipoxigenasa (LOX) (Ec.1.13.11.12) es importante a nivel industrial en la conservación de vegetales ya que se le atribuyen cambios en el sabor causados por

el desarrollo de la rancidez oxidativa. Es una de las enzimas más estudiadas en vegetales (Gardner, 1991); esto se debe a las modificaciones oxidativas de los ácidos grasos poliinsaturados con estructura *cis,cis*-1,4-pentadieno en las plantas superiores. Los sustratos específicos para lipoxigenasa son ácidos grasos como el ácido linoleico (C18:2, ω -6) y linolénico (C18:3, ω -3) (Galliard y Phillips, 1971); que son los más abundantes en la fracción lipídica de las membranas de los vegetales (Chen y col., 2004).

La LOX cataliza la adición de oxígeno molecular en el C-9 o C-13 de los ácidos grasos poliinsaturados formando hidroperóxidos (ROOH) (Galliard y Chan, 1980). La división de los ROOH forma aldehídos de cadena corta y oxácidos a través de la adición de la enzima ácido graso hidroperóxido liasa (HPL).

La LOX contiene como cofactor hierro no hemínico, éste se localiza en el centro activo unido por cuatro histidinas optando una disposición plana. Klein y col. (1985) demostraron la existencia de dos residuos de triptófano esenciales en el sitio activo de la enzima, que son importantes para la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados. En la Fig.2-2 se muestra la estructura terciaria de la LOX, en el centro se puede evidenciar el hierro no hemínico. La reacción catalítica de esta enzima se debe a la oxidación del cofactor, cuando el Fe^{2+} se oxida a Fe^{3+} , se genera: (i) Que del sustrato oxidable (ácido graso polinsaturado) pierda un átomo de hidrógeno del grupo pentadieno, oxidable luego a H^+ . (ii) El radical pentadienilo unido a la enzima se transforma en un sistema conjugado que reacciona con el oxígeno.

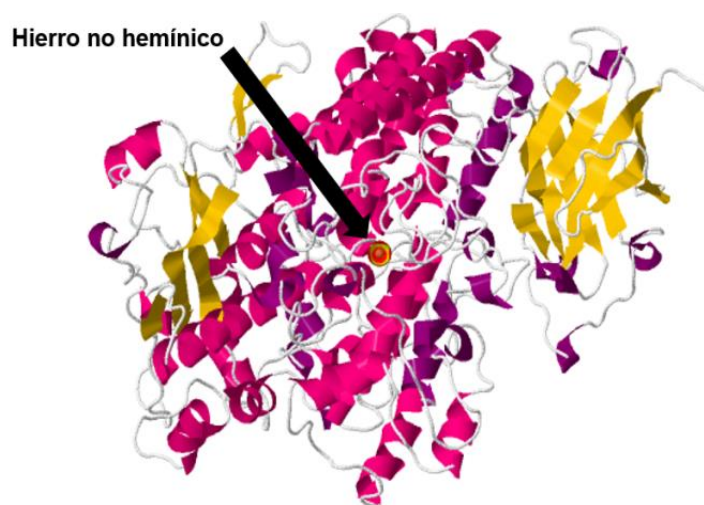


Fig. 2-2 Estructura en 3D de la lipoxigenasa obtenida del poroto de soja (Skrzypczak-Jankun, E. y col., 2006)

El radical peróxido formado es reducido por la enzima y por fijación de un protón se forma el hidroperóxido. Una vez formados los hidroperóxidos se pueden seguir las etapas de propagación y terminación. Sin embargo, en algunos vegetales existen sistemas enzimáticos que transforman los hidroperóxidos en sustancias volátiles.

En la Fig.2-3 se muestra el proceso para el ácido linoleico en el cual por acción de la LOX se genera hidroperóxidos como el 9-Hidroperoxi C18:2 y 13-Hidroperoxi C18:2, los cuales reaccionan con la enzima hidroperóxido-liasa (HPL) formando compuestos como el hexanal, que sigue reaccionando con la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) para generar el hexanol.

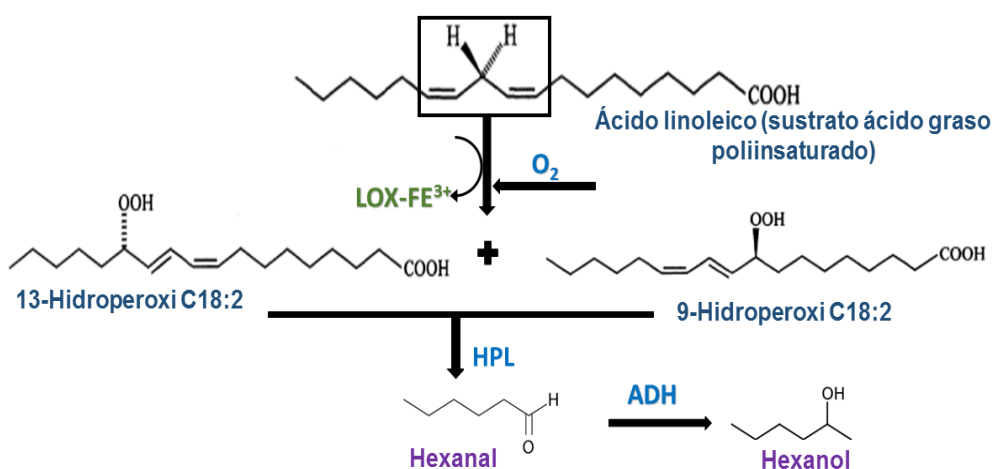


Fig. 2-3 Reacción de enzimática de la LOX generando la oxidación del ácido linoleico produciendo los correspondientes hidroperóxidos (13-Hidroperoxi C18:2 y 9 Hidroperoxi C18:2) y compuestos volátiles secundarios como el hexanal

La LOX también puede atacar a varios compuestos que tienen dobles enlaces en su estructura química, entre los cuales, tenemos los pigmentos naturales como el β -caroteno y las clorofilas. Su acción decolorante sobre esas estructuras se ha usado en el blanqueado de harinas de cereales, como en el caso de harina de soja (Sheu y Chen, 1991).

Se ha identificado la presencia de LOX en diferentes órganos de la planta exhibiendo actividad enzimática variable; en las células se encuentra en cloroplastos, mitocondrias y citoplasma (Vernooy-Gerritsen y col., 1983)

Estudios sensoriales en leguminosas verdes (arvejas y chauchas) indicaron que la presencia de la LOX es la responsable de modificaciones indeseables de sabor y aroma, por eso fue seleccionada como indicadora de un adecuado tratamiento térmico previo a la congelación.

Algunos estudios asocian cambios de color a la LOX, un caso puntual es el discutido por Oszmianski y Lee (1990) en el cual por medio de la enzima purificada y pigmentos naturales se crean sistemas modelos en base a carotenos, los cuales pueden ser degradados generando compuestos incoloros debido al poder oxidativo de la LOX. En sistemas reales la AE de la LOX que degrada carotenos puede ser inhibida por compuestos fenólicos, ácidos como el ferúlico y *p*-cumárico (Oszmianski y Lee, 1990); por otra parte en el caso vegetales congelados las clorofilas pueden llegar a afectarse por causa de los hidroperóxidos formados en el ciclo de reacción de la LOX ya que los ROOH pueden actuar oxidando la α -clorofila (Kidmose y col., 2002).

Experimentalmente la AE de LOX se determina mediante la reacción del hidroperóxido conjugado formado de la oxidación de un sustrato como el ácido linoleico, en la cual se presentan dienos conjugados (Axelrod y col., 1981). Los hidroperóxidos procedentes de la oxidación enzimática generan un cromóforo característico que absorbe a 234 nm, por eso su formación puede ser monitoreada en forma continua en mezclas ópticamente transparentes o de forma discontinua por extracción con disolventes (Surrey, 1964).

Para esta determinación se debe lograr una buena disponibilidad por parte de la enzima de los ácidos grasos utilizados como sustrato, dada su escasa solubilidad en agua. Además las dispersiones de ácidos grasos son inestables, formando agregados multimoleculares, incluyendo dímeros y micelas; por eso se suelen utilizar tensioactivos (Tween-20, Triton X-100, etc) (Sanz y col., 1992). También se debe utilizar hidróxido de sodio para aclarar la emulsión formada entre el ácido graso poliinsaturado y el tensioactivo ya que la base fuerte saponifica los residuos hidrófobos del tensioactivo. Los valores de pH óptimos de actividad enzimática en la mayoría de los casos están entre 5.5 y 7.0.

2.3.2. Peroxidasa

Las peroxidasas son una gran familia de óxido-reductasas que se ubican en plantas, animales y microorganismos y actúa en presencia de peróxido de hidrógeno y oxígeno libre (Lagrimini y col., 1993). Esta enzima se encuentra en la mayoría de los vegetales y frutas (Burnette, 1977). Dentro de la clasificación de las peroxidasas se encuentran la clase III, estas son originadas por la secreción en plantas; éstas son glicoproteínas monoméricas que se caracterizan por tener puentes disulfuro. Dentro

de este grupo la más estudiada es la peroxidasa-C o comúnmente conocida como la peroxidasa de rabano (EC 1.11.1.7); su nombre se debe a que esta enzima se aisló por primera vez de raíces de rábano (Ruiz-Dueñas, 1998). En la estructura química el sitio activo de la peroxidasa (POD) presenta un cofactor prostético, correspondiente a un grupo hemo siendo una hemoproteína, además posee un Fe (III); éste es coordinado con dos iones calcio y ocho sulfhidrilos formando cuatro puentes disulfuro entre las cisteínas presentes (Watanabe y col., 2010).

Esta enzima presenta una alta estabilidad térmica, y por ello se la emplea frecuentemente como parámetro indicador del proceso de inactivación enzimática. La POD oxida compuestos fenólicos generando pardeamiento en vegetales (Velasco y col., 1989; Williams y col., 1986), además la POD es un catalizador orgánico del complejo hierro - porfirina provocando cambios indeseables en el color cuando se combina con peróxido de hidrógeno para producir radicales libres fitotóxicos. Estos fitotóxicos reaccionan con componentes como el ácido ascórbico, carotenoides y ácidos grasos, provocando la pérdida de algunos nutrientes (Brewer y Begum, 2003). El peróxido de hidrógeno se genera durante la degradación enzimática del ácido ascórbico.

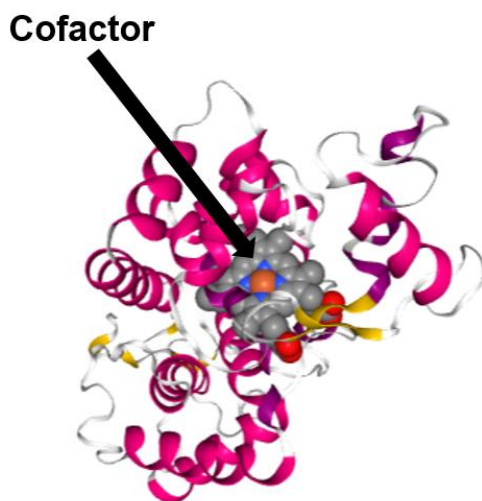


Fig. 2-4 Estructura secundaria de la peroxidasa obtenida del poroto de soja (Henriksen, A. y col., 2001)

Dado que la POD genera estas reacciones indeseables es necesario encontrar las condiciones de proceso que logren su inactivación. Se ha reconocido que a diferencia de muchas enzimas, la POD es generalmente intracelular al igual que la LOX (Nagodawithana y Reed, 1993). En la célula se pueden encontrar dos tipos diferentes de POD, la soluble que está asociada al citoplasma y la insoluble la cual

está enlazada iónicamente o covalente a la pared celular (Vámos-Vigyázó y Haard, 1981).

La enzima POD se ha seleccionada dado que está presente en la mayoría de vegetales y frutas y presenta una gran resistencia térmica que facilita su detección durante el proceso (Nagodawithana y Reed, 1993;Schwimmer, 1981). Se ha reportado que una concentración residual de peroxidasa de 7.5 - 11% en repollitos de Bruselas (Williams y col., 1986) genera un producto de calidad aceptable. Sin embargo, no se ha reportado hasta el momento cuáles son los tiempos de procesamiento térmico que permiten lograr una concentración final de POD aceptable en un vegetal de dimensiones reales donde el perfil interno de temperaturas varía según las propiedades termofísicas del alimento y las condiciones operativas externas del tratamiento térmico (baño termostático , vapor de agua, etc.).

La reacción típica de esta enzima en la cual se forma compuestos pardos como las quinonas es:

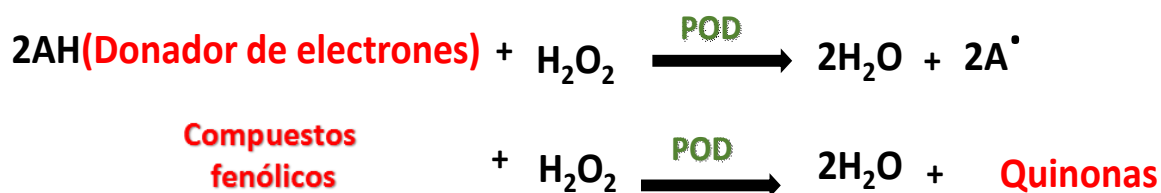


Fig. 2-5 Reacción química en la cual se genera compuestos pardos (quinonas) por acción de la POD

Experimentalmente la determinación de la AE de POD se puede realizar mediante el uso de compuestos donadores de oxígeno como sustratos de reacción, entre estos se encuentra el pirogalol, guayacol, o-dianisidina y 4-aminoantipirina (Soysal y Söylemez, 2005).

La o-dianisidina es el mejor sustrato para determinar la AE debido a la alta especificidad que exhibe la enzima hacia este compuesto, el problema de usar la o-dianisidina experimentalmente radica en que este compuesto es altamente cancerígeno para el ser humano (Trinder, 1966).

La mayoría de los trabajos adoptan el uso del guayacol, que fue usado inicialmente por Ponting y Joslyn (1948) como base del sustrato para determinar AE en tejidos de manzanas. Desde ese entonces esta prueba ha sido ampliamente utilizada en la industria para evaluar la calidad del escaldado. El guayacol fue establecido como el

reactivo oficial para el sustrato en las mediciones de AE de POD por el Servicio de Comercialización Agrícola del USDA (Burnette, 1977).

El guayacol es fácilmente oxidable en contacto con peróxido de hidrógeno y en presencia de la POD genera el complejo coloreado llamado tetraguayacol cuyo color ladrillo absorbe a 470 nm, por lo cual la AE puede determinarse espectrofotométricamente, en la Fig.2-6 se muestra esta reacción.

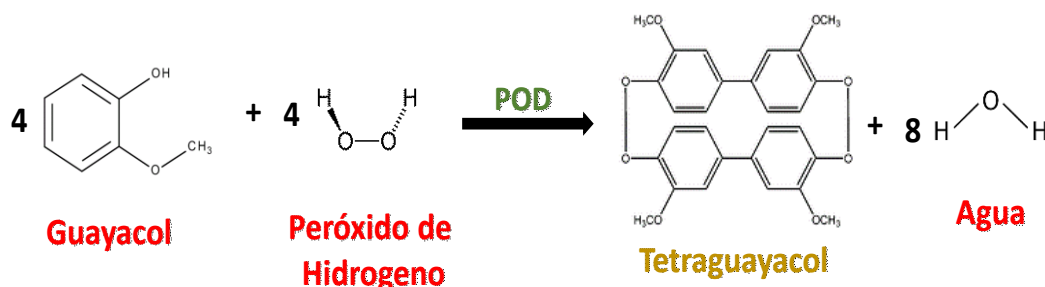


Fig. 2-6 Oxidación del guayacol catalizada por la POD en presencia de Peróxido de hidrógeno formando el complejo coloreado tetraguayacol

2.4. MATERIALES Y MÉTODOS

2.4.1. Composición proximal

La composición proximal se obtuvo para cada uno de los macronutrientes, humedad y cenizas siguiendo la metodología descrita por la (AOAC, 2010). El contenido de humedad se determinó mediante el método gravimétrico de secado de muestra en estufa a 100°C hasta alcanzar un peso seco constante entre dos pesadas consecutivas.

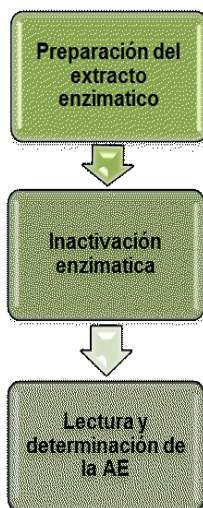
El contenido de proteína cruda se determinó por el método de Kjeldahl, utilizando un factor de conversión de 6.25 para transformar nitrógeno total a proteína bruta (Lisiewska y col., 2009).

Los lípidos se determinaron utilizando el método Soxhlet empleando éter etílico. El contenido de cenizas se obtuvo mediante la calcinación de las muestras en mufla a 550°C durante 8 horas.

El contenido de carbohidratos por diferencia con los demás componentes principales determinados experimentalmente.

2.4.2. Preparación del extracto enzimático e inactivación enzimática

Las etapas para la determinación de la cinética de inactivación térmica fueron:



El extracto enzimático se preparó pesando 20 g de brócoli y 30 g de repollito de Bruselas para la determinación de LOX y 1.5 g para POD de los dos vegetales en balanza analítica, modelo AB204 (Mettler Toledo, Suiza) con 0.1 mg de precisión. Luego se desintegra y homogeneiza en procesadora La Moulinette, modelo Dp800 (Moulinex, Bogotá, Colombia). Se mezcló con 100 mL de buffer de fosfato 0.2 M pH 6.5 a 4°C llevando la muestra a un Stomacher Lab blender modelo 400 (Seward Medical Limited Co., London, Reino Unido) durante 5 minutos; pasado el tiempo se filtró usando un lienzo.

El filtrado fue centrifugado por 30 minutos a 4 °C y una velocidad de 18000 x g usando centrífuga Beckman Avanti modelo J-25 (Beckman Instruments Inc., Palo Alto, Calif., U.S.A) con un rotor JA-2550. El precipitado fue descartado filtrando con papel filtro cuantitativo. El filtrado que correspondía al extracto enzimático se colocó en microtubos de polipropileno de pequeño volumen (0.2 mL) usados comúnmente en análisis de PCR.

Las muestras preparadas para la evaluación de la actividad enzimática se criopreservaron inicialmente a -196°C y posteriormente se mantuvieron en cámara de -80°C hasta su análisis, no superando las 48 horas de almacenamiento en todos los casos. Los extractos contenidos en los microtubos se sumergieron en un baño termostático Techne Modelo FTE-10DDC (Bibby-scientific Ltda, Stone Staffordshire Reino Unido) para el ensayo de inactivación térmica. Las temperaturas de ensayo fueron 75, 80 y 90°C, y los tiempos de extracción variaron entre 0 y 400 segundos con extracciones cada 10-20 segundos. A una temperatura fija del baño se retiraron las muestras a distintos tiempos de calentamiento. Inmediatamente se enfriaron en

un baño a 0°C para frenar el proceso térmico; cada ensayo de inactivación enzimática se realizó por duplicado. La Fig. 2-7 ejemplifica el procedimiento.

2.4.3. Determinación de la actividad enzimática

Luego de ser inactivado el extracto se detectó la AE por espectrofotometría usando un espectrofotómetro Hitachi modelo U-1900 (Hitachi High-Technologies Corporation, Osaka, Japón), mezclando 0.120 mL del extracto enzimático con 3.5 mL del sustrato, este procedimiento se repitió para las dos enzimas; en el caso de la POD se analizó según Morales-Blancas, Chandia, y Cisneros-Zevallos (2002) formulando el sustrato con 0.1 mL de peróxido de hidrógeno (30% m/v), 0.1 mL de guayacol (99 % m/v) y completando el volumen a 100 mL con buffer de fosfato de potasio 0.1 M pH 6.5.

Para la LOX se utilizó el método descrito por Morales-Blancas y col. (2002) y Szymanowska, Jakubczyk, Baraniak, y Kur (2009) en el cual el sustrato fue preparado mezclando 78.6 µL de ácido linoleico (>98%) marca Sigma, 78.6 µL de Tween-20 y 10 mL agua destilada. La solución fue clarificada agregando 1 mL de NaOH 1M, y se llevó a 100 mL con buffer de fosfato de potasio 0.2 M pH 6.5. Tanto para la POD como para la LOX el cambio de la absorbancia fue monitoreada durante 400 segundos a una longitud de onda específica para cada enzima (470 nm para la POD y 234 nm para la LOX).

Se define que una U es igual al cambio de la absorbancia por unidad de tiempo (minuto). El % AE residual se obtiene de U/U_0 , donde U es la actividad de la enzima después del proceso térmico de inactivación y U_0 es la AE del producto fresco. Para determinar el U_0 de cada una de las temperaturas de ensayo (75,80 y 90 °C) se realizó la medida de la AE del producto fresco por sextuplicado y cada ensayo de inactivación enzimática se realizó por duplicado.

2.4.4. Análisis estadístico

Las regresiones no lineales y los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software OriginPro 8 (Origin Corporation, Northampton, MA, EE.UU.) y SYSTAT 12.0 (Systat Software, Evanston, IL, EE.UU.).

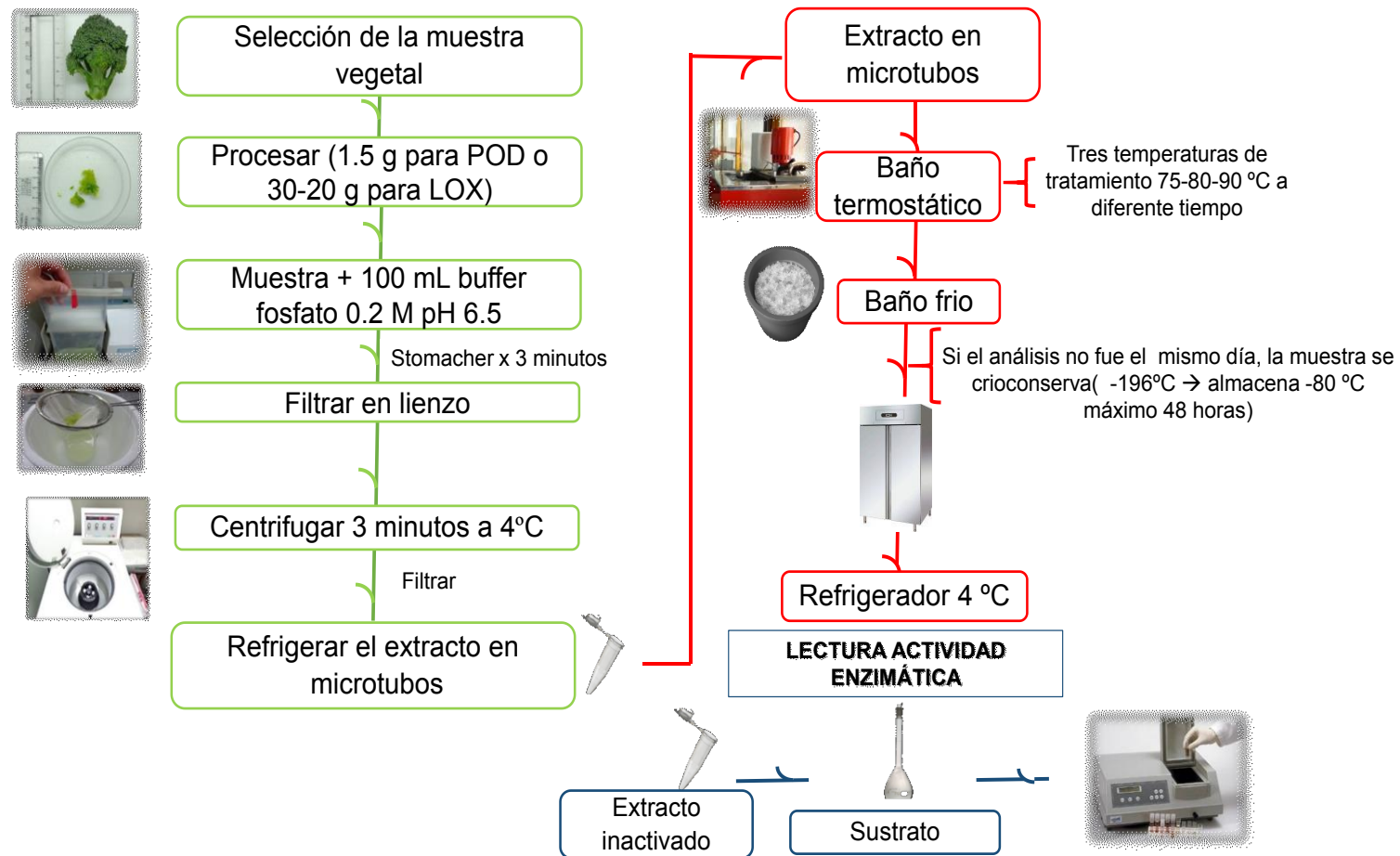


Fig. 2-7 Procedimiento experimental para la determinación de la AE de POD y LOX de brócoli y repollito de Bruselas

2.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.5.1. Composición proximal

La composición proximal se muestra en la Tabla 2-2. Los valores resultan comparables con los datos reportados por la USDA (2015).

Tabla 2-2 Porcentajes de la composición proximal para brócoli y repollito de Bruselas. Los valores expresados corresponden a el promedio y la desviación estándar entre paréntesis

	Brócoli		Repollito de Bruselas	
Humedad	87.06 (1.88)	89.30 ^a	83.54 (0.55)	86.00 ^a
Proteínas	3.16 (0.09)	2.82 ^a	3.20 (0.09)	3.38 ^a
Lípidos	1.27 (0.02)	0.37 ^a	0.36 (0.02)	0.30 ^a
Cenizas	0.94 (0.02)	0.81 ^a	1.19 (0.02)	1.37 ^a
Carbohidratos	7.57	6.64 ^a	11.74	8.95 ^a

^a valores reportados por USDA (2015)

n = 10 para proteínas; n=6 para lípidos, humedad y cenizas

2.5.2. Cinéticas de inactivación térmicas

2.5.2.1. Actividad enzimática inicial y curvas de inactivación enzimática

Los tratamientos térmicos son una de las operaciones unitarias más importantes para la producción de diferentes productos vegetales (pre-cocido congelados, enlatados, deshidratación, etc.). La actividad enzimática en los vegetales es responsable de alteraciones indeseables. Por lo general, los vegetales crudos no pueden ser almacenados por largos períodos de manera congelada ya que aún a bajas temperaturas las reacciones enzimáticas producen su senescencia (Canet y col.,2004).

Los tratamientos de pre-cocción proporcionan estabilidad a los vegetales manteniendo los atributos sensoriales de calidad (sabor, aroma y color) gracias a la inactivación enzimática (Canet y col.,2004), además se puede asegurar que algunos compuestos termolábiles como el ácido ascórbico o los polifenoles no se degraden. Investigaciones como la de Olivera y col., (2008) y Patras y col., (2011) han reportado la importancia de encontrar las mejores condiciones de tratamiento térmico, evitando la pérdida de compuestos bio-activos en la etapa de pre-cocción. Estas investigaciones fueron realizadas para diferentes tipos de vegetales: repollitos

de Bruselas (Olivera y col.,2008), arvejas, brócoli y zanahorias (Petras y col., 2011), en las cuales se reportó que se puede lograr potencializar el contenido de estos compuestos bio-activos.

Estos autores indican que en las mejores condiciones de tratamiento después del almacenamiento congelado se obtienen productos que conservan buenas características sensoriales y nutricionales para su consumo.

El proceso térmico trata de la exposición de tejidos vegetales al vapor o agua caliente por un tiempo determinado a una temperatura específica. Cuando se usa agua caliente por lo general se lleva a cabo entre 75 y 95 °C durante entre 1 a 10 minutos, dependiendo del tamaño de las piezas vegetales.

Los tiempos típicos de pre-cocción en agua a 95°C son 2-3 minutos para chauchas y brócoli, 4-5 minutos para repollitos de Bruselas, y 1-2 minutos para las arvejas (Holdsworth, 1985), sin embargo no hay una regla general que contemple diversas geometrías y dimensiones dado que el tiempo de proceso depende de varios factores (propiedades termofísicas, condiciones operativas del fluido calefaccionante (agua o vapor), geometría y dimensiones del vegetal, entre otros).

La optimización del proceso de pre-cocción implica la medición de la tasa de destrucción de la enzima responsable de su deterioro. La selección de una enzima como indicadora de la idoneidad de un proceso de inactivación es crítico para el éxito de la operación debido a que cada enzima posee un comportamiento cinético diferente; se busca que el proceso térmico incluya la inactivación enzimática de las enzimas seleccionadas, de esta forma se logra garantizar que el producto se proteja contra el deterioro de las características de calidad para su consumo y al mismo tiempo se minimice la pérdida nutricional. Las enzimas POD y LOX son las más adecuadas para el estudio de optimización del proceso de precocción de brócoli y repollitos de Bruselas (Bahçeci, Serpen, Gökmen, y Acar, 2005).

En la Tabla 2-3 se muestra la AE inicial de la POD y la LOX para el brócoli y el repollito de Bruselas frescos determinadas en diferentes unidades, para el caso de Uo/mg proteína se usó el valor determinado de proteína en la composición proximal. En las Fig.2-8a y b se muestran las curvas de inactivación enzimática obtenidas para la POD del brócoli y el repollito de Bruselas, de igual forma para la LOX en las Fig. 2-9a y c.

Tabla 2-3 Actividades Enzimáticas iniciales, los valores reportados corresponden al promedio con su correspondiente desviación estándar con un n=6

AE	Brócoli	Repollito de Bruselas
Actividad POD	Promedio	Promedio
Uo/g peso seco	345.60 (19.84)	457.08 (64.87)
Uo/mL extracto enzima	0.714 (0.041)	1.130 (0.160)
Uo/mg proteína	1.452 (0.081)	2.351 (0.333)
Actividad LOX		
Uo/g peso seco	69.39 (7.54)	44.89 (4.24)
Uo/mL extracto enzima	1.730 (0.188)	2.217 (0.210)
Uo/mg proteína	0.274 (0.028)	0.231 (0.022)

Según las Figs. 2-8 y 2-9 se observa que las enzimas analizadas presentan un comportamiento bifásico en los rangos de temperatura ensayados (75 a 90 °C) con dos fracciones (isoenzimas) térmicamente diferentes, una fracción termo-lábil y otra termo-resistente; por este motivo se usó el modelo propuesto por Ling y Lund (1978) para determinar los parámetros cinéticos. Para el caso del Brócoli este fenómeno ha sido reportado en ambas enzimas (Morales-Blancas y col., 2002; Güneş y Bayindirli, 1993). En cambio, en repollitos de Bruselas teniendo en cuenta la revisión de bibliografía realizada este comportamiento cinético bifásico no había sido determinado.

En el caso de POD (Fig. 2-8 a, b) se puede observar que durante los primeros 150 s la inactivación de la fracción termo-lábil se produjo en los dos vegetales. En tiempos más largos el %AE residual de la fracción termo-resistente fue de menos de 20% para los dos vegetales. Para LOX (Fig.2-9 a, b) se puede observar que la inactivación térmica de la isoenzima termo-lábil se lleva a cabo durante los primeros 100 s para los dos vegetales. Después de este tiempo la fracción termo-resistente de LOX se mantuvo con una AE residual superior a 20%, incluso a 400 s. Este mismo fenómeno se reportó para la AE residual de LOX en brócoli (Morales-Blancas y col., 2002) donde durante el tratamiento térmico a 95°C y superando un tiempo de proceso de 500 s la actividad enzimática residual tenía un valor de 30%. En el caso de los espárragos verdes el % de AE residual de LOX era del 40% (temperaturas 70-95°C, 600 s de tiempo) (Morales-Blancas y col., 2002).

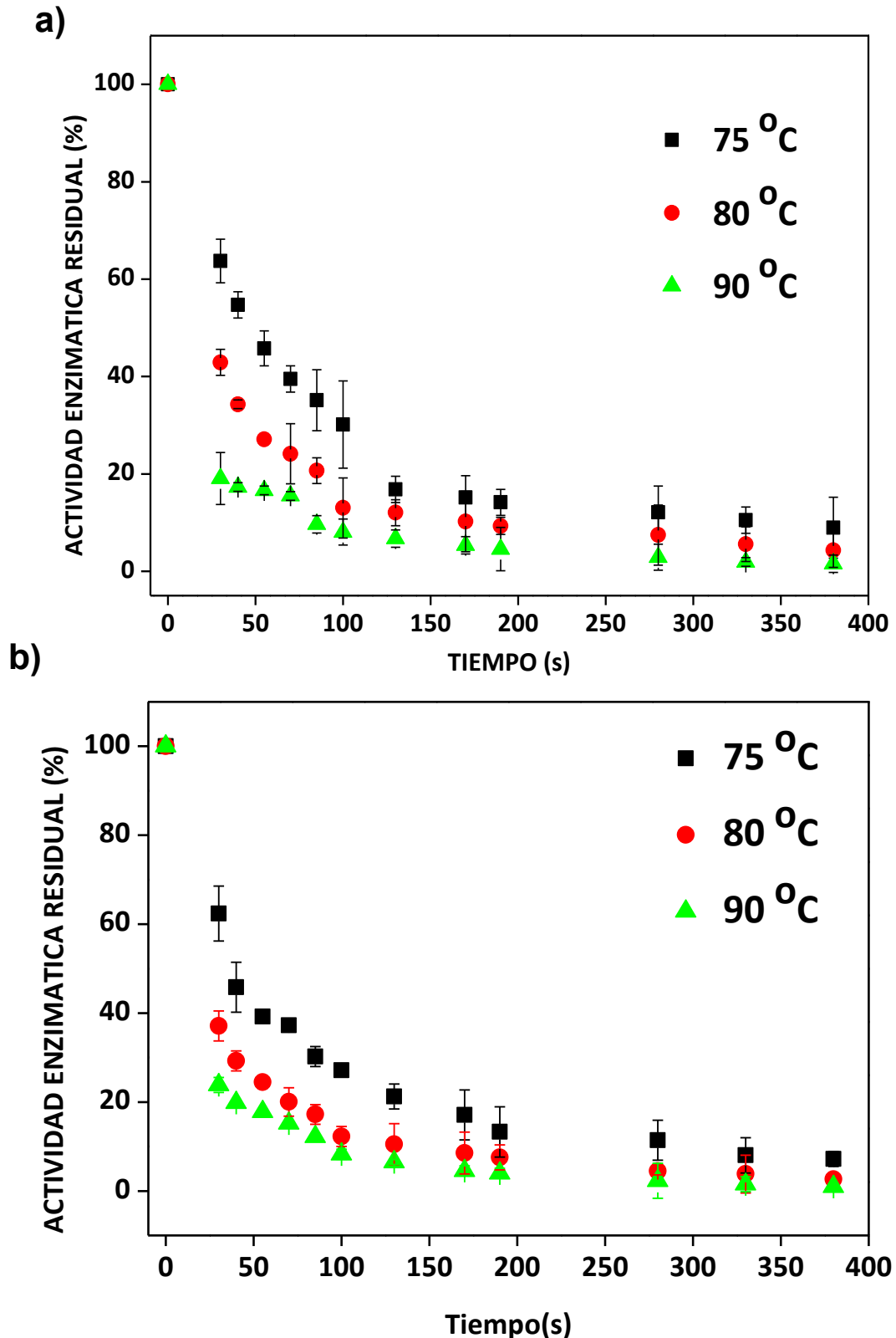


Fig.2- 8 Curvas de inactivación a diferentes temperaturas para la peroxidasa (POD) en (a) Brócoli (b) repollitos de Bruselas. Las barras de error muestran el intervalo de confianza (IC) al 95% de los datos experimentales para un n=2. Símbolos representa los valores medios experimentales

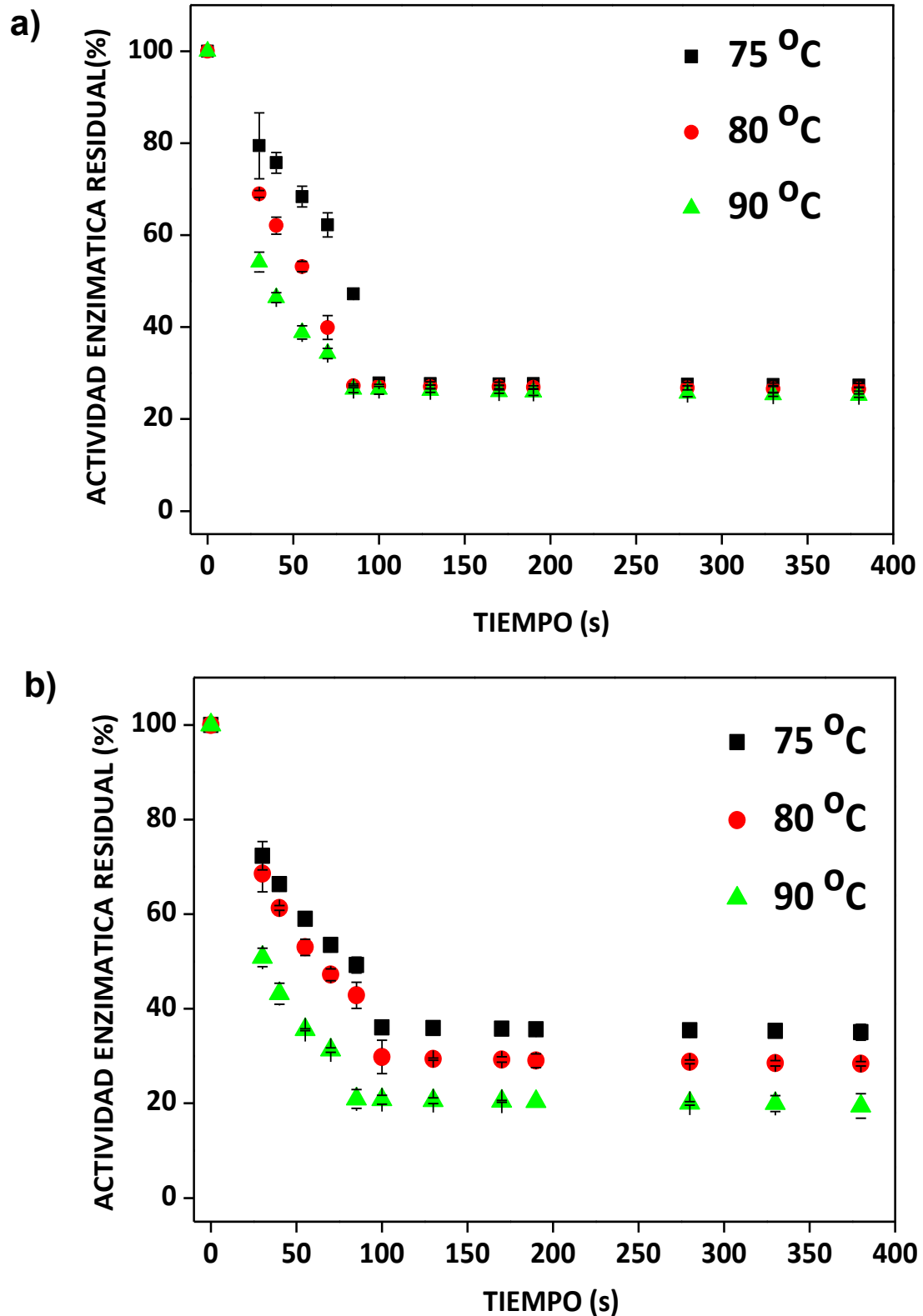


Fig. 2-9 Curvas de inactivación a diferentes temperaturas para la lipoxigenasa (LOX) en (a) Brócoli (b) repollitos de Bruselas. Las barras de error muestran el intervalo de confianza (IC) al 95% de los datos experimentales para un n=2. Símbolos representa los valores medios experimentales

2.5.2.2. Parámetros cinéticos de la POD y LOX en la inactivación térmica enzimática.

Para cada enzima existe una temperatura óptima de actividad, el aumento de la temperatura provoca su desnaturalización. Como se discutió, ambas enzimas presentan una curva de inactivación bifásica (Anese y Sovrano, 2006; Anthon y Barrett, 2003; Gonçalves y col., 2009; Güneş y Bayindirli, 1993; Lin y col., 2012; Morales-Blancas y col., 2002; Saraiva, Oliveira, Lemos, y Hendrickx, 1996; Soysal y Söylemez, 2005; Thongsook y Barrett, 2005), lo que demuestra la presencia de fracciones termolábil y termo resistente de una misma enzima.

Cada fracción térmicamente diferente puede ser modelada para obtener los parámetros cinéticos característicos de la fracción térmicamente resistente como la de la fracción térmicamente lábil, obedeciendo cada una de ellas a una cinética de primer orden (Ling y Lund, 1978).

Este modelo se ha aplicado para la POD en varias especies como tomates, papas, zanahorias, espárragos, chauchas, arvejas, calabaza y brócoli (Agüero y col., 2008; Kuroiwa y col., 2006; Morales-Blancas y col., 2002; Yemenicioğlu, Özkan y Cemeroğlu, 1998).

Modelo de Ling y Lund

El modelo de Ling y Lund (1978) es usado para analizar las cinéticas de inactivación enzimáticas de las fracciones de isoenzimas con distinta estabilidad térmica (fracciones lábil y resistente). El comportamiento bifásico se muestra en la Fig.2-10.

Suponiendo que cada fracción sigue una cinética de inactivación de primer orden, el %AE se puede expresar como matemáticamente como:

$$\%AE = \frac{Co_R \cdot e^{-k_R t} + Co_L \cdot e^{-k_L t}}{Co_R + Co_L} \quad (2-1)$$

donde t es el tiempo (s) de calentamiento a temperatura constante, Co_L y Co_R son las concentraciones iniciales de la isoenzima termolábil y termoresistente en unidades de actividad enzimática (AE/g seco), y k_L y k_R son constantes de reacción de inactivación térmica (1/s).

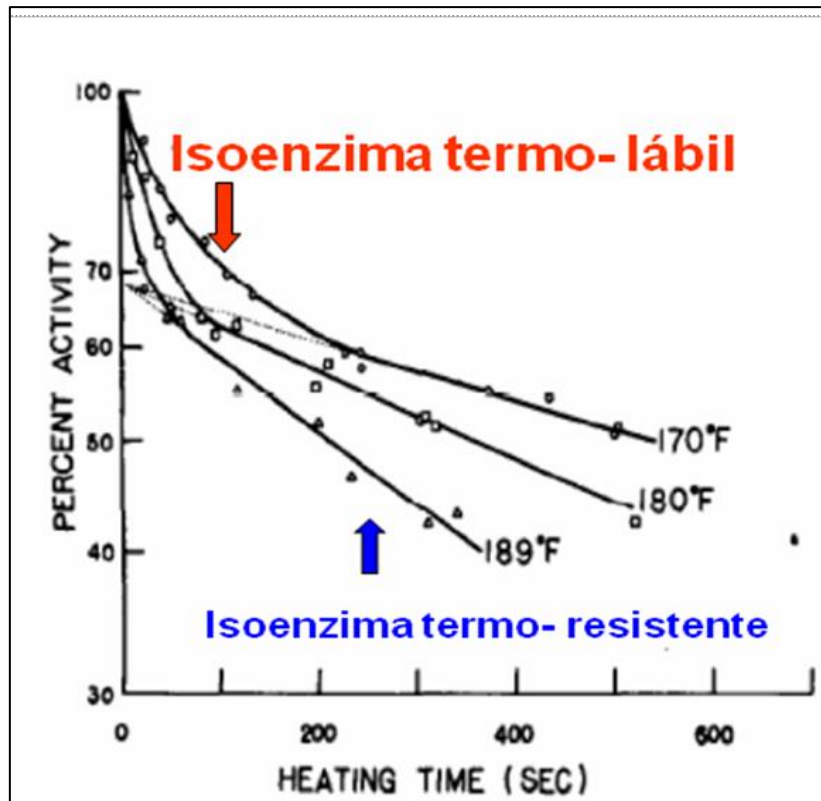


Fig. 2-10 Curva de inactivación térmica de peroxidasa que presenta las dos fracciones térmicamente diferentes a distintas temperaturas para rábanos. (Lind y Lund, 1978)

Teniendo en cuenta el modelo de Ling y Lund (1978), la fracción térmicamente lábil de enzima es completamente inactivada a tiempos largos de calentamiento, por lo tanto el término $e^{-k_L t}$ de la Ec.2-1 tiende a cero, obteniendo la ecuación:

$$\%AE = \frac{C_{OR}}{C_{OR} + C_{OL}} \cdot e^{-k_R t} \quad (2-2)$$

Se define la fracción de la isoenzima resistente α_R como:

$$\alpha_R = \frac{C_{OR}}{C_{OR} + C_{OL}} \quad (2-3)$$

Por otro lado, a cortos tiempos de calentamiento la fracción resistente inactivada se consideró despreciable por lo tanto en la Ec.2-1 el término $e^{-k_R t}$ tiende a 1, obteniendo la ecuación:

$$\%AE = \frac{C_{OR} + C_{OL} \cdot e^{-k_L t}}{C_{OR} + C_{OL}} = \alpha_R + \alpha_L \cdot e^{-k_L t} \quad (2-4)$$

donde α_L es la fracción porcentual de la isoenzima lábil. A partir de las ecuaciones 2-2 y 2-4 y con los resultados obtenidos de las cinéticas de inactivaciones (Fig.2-8 y 2-9) se realizaron las correspondientes regresiones no lineales para cada enzima en vegetales, los resultados se presentan en las Fig.2-11 y 2-12.

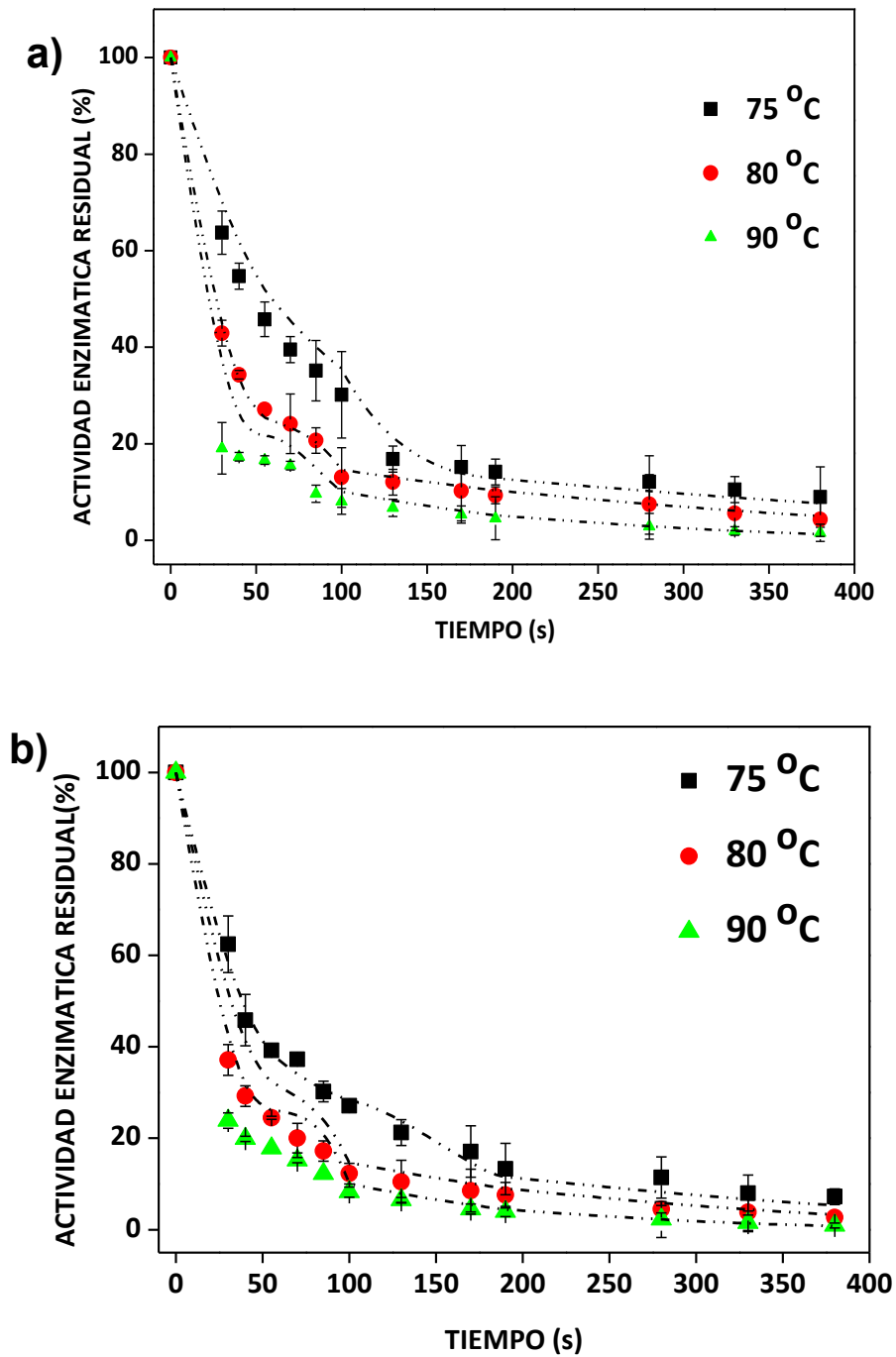


Fig. 2-11 Curvas de inactivación a diferentes temperaturas para la peroxidasa (POD) en: (a) Brócoli (b) repollitos de Bruselas. Las barras de error muestran el intervalo de confianza (IC) al 95% de los datos experimentales para un n=2. Símbolos representa los valores medios experimentales y líneas punteadas valores predichos a partir de las regresiones no lineales

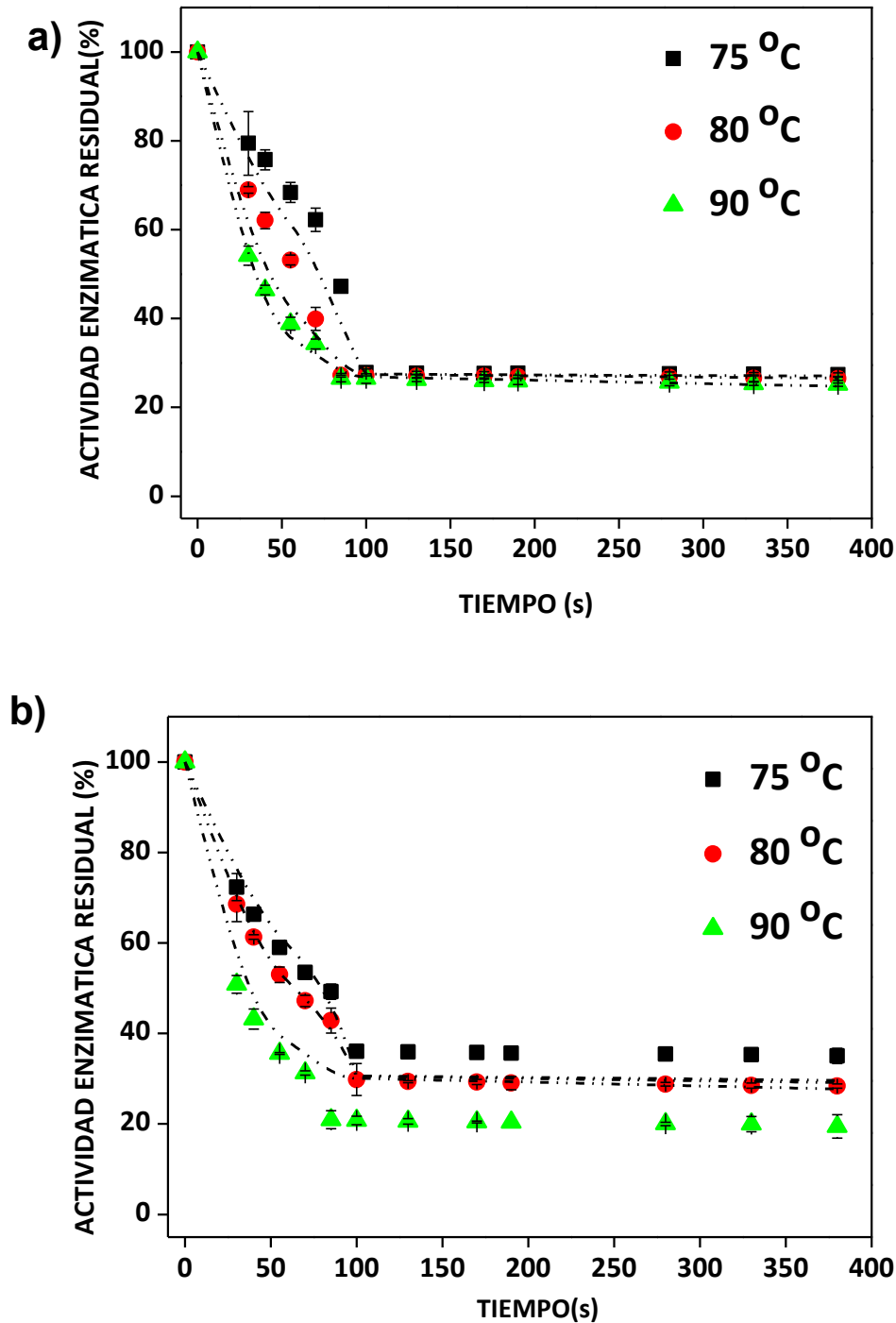


Fig. 2-12 Curvas de inactivación a diferentes temperaturas para la lipoxigenasa (LOX) en: (a) Brócoli (b) repollitos de Bruselas. Las barras de error muestran el intervalo de confianza (IC) al 95% de los datos experimentales para un $n=2$. Símbolos representa los valores medios experimentales y líneas punteadas valores predichos a partir de las regresiones no lineales

2.5.2.3. Determinación de las constantes térmicas de inactivación

Los resultados mostrados en las curvas de inactivación enzimática y las correspondientes regresiones no lineales (Fig. 2-11 y 2-12) permitieron distinguir dos

fracciones térmicamente diferentes y a partir de estas y aplicando la Ec.2-2 se calculó la constante de inactivación de la isoenzima resistente (k_R) a cada temperatura (75, 80 y 90 °C) y la fracción porcentual de la enzima resistente (α_R) (Yamamoto, Steinberg, y Nelson, 1961).

Las constantes cinéticas de la fracción termolábil (k_L), se calcularon utilizando la Ec. 2-4 por regresión no lineal introduciendo el α_R como parámetro determinado previamente. Los parámetros obtenidos a cada temperatura para esta regresión fueron las constantes cinéticas de la isoenzima lábil (k_L) y la concentración porcentual de dicha fracción (α_L). Las constantes para POD y LOX a cada temperatura se presentan en la Tabla 2-4, incluyendo la desviación estándar.

Tabla 2-4 Constantes térmicas de inactivación estimadas a diferentes temperaturas para la fracción resistente (k_R) y lábil (k_L) de peroxidasa (POD) y lipoxigenasa (LOX). Los valores que se muestran son el resultado de las regresiones no-lineales con las correspondientes desviación estándar en paréntesis y el coeficiente de determinación (R^2)

T (°C)	POD					LOX				
	$k_L \times 10^2 (s^{-1})$ n= 10	R^2	$k_R \times 10^3 (s^{-1})$ n= 14	R^2		$k_L \times 10^2 (s^{-1})$ n= 8	R^2	$k_R \times 10^4 (s^{-1})$ n= 16	R^2	
Brócoli										
75	2.38 (0.09)	0.98	2.41 (0.13)	0.97		1.66 (0.21)	0.99	0.49 (0.5)	0.89	
80	5.39 (0.46)	0.95	3.83 (0.19)	0.97		2.89 (0.29)	0.93	1.07 (0.43)	0.98	
90	6.66 (0.93)	0.88	6.15 (0.18)	0.99		3.26 (0.03)	0.99	1.79 (0.78)	0.97	
Repollito de Bruselas										
75	3.11 (0.21)	0.95	3.85 (0.36)	0.93		1.85 (0.02)	0.99	0.80 (0.04)	0.98	
80	4.24 (0.42)	0.92	5.37 (0.15)	0.98		2.05 (0.02)	0.99	1.61 (0.16)	0.89	
90	7.87 (0.18)	0.99	7.47 (0.24)	0.98		2.80 (0.06)	0.98	2.14 (0.18)	0.90	

En el caso de POD las constantes k_L y k_R fueron mayores para las repollitos de Bruselas en comparación con los valores de brócoli. Morales-Blancas y col., (2002) establecieron que para la POD el $k_L = 4.96 \times 10^2 s^{-1}$ y $k_R = 3.57 \times 10^3 s^{-1}$ a 80 °C y para LOX $k_L = 2.23 \times 10^2 s^{-1}$ y $k_R = 1.26 \times 10^4 s^{-1}$ a la misma temperatura en brócoli.

Gonçalves y col., (2009) informaron también para el brócoli un valor de $k = 0.54 \times 10^3$

s⁻¹ a 80°C para POD, sin embargo, estos los autores utilizaron un comportamiento cinético monofásico de primer orden de reacción.

2.5.2.4. Determinación de las energías de activación del proceso térmico

El efecto de la temperatura en las constantes de inactivación térmica se puede describir en función de la energía de activación siguiendo la ley de Arrhenius según:

$$k = k_{REF} \cdot \exp \frac{-E_a(T_{REF}-T)}{R(T_{REF} \times T)} \quad (2-5)$$

En la Ec.2-5, T es Temperatura (K), k_{REF} es la contante de referencia a una temperatura determinada (T_{REF}) la cual corresponde 353 K, R es la constante de los gases ($R=8.31$ J/mol K), E_a es la energía de activación (J/mol) de la isoenzima lábil o resistente.

Conociendo el comportamiento cinético de la inactivación enzimática se puede observar que a medida que la temperatura disminuye, la velocidad de la reacción decrece. Las bajas temperaturas reducen pero no detienen la actividad enzimática, por consiguiente un producto puede deteriorarse debido a la continuidad de la actividad enzimática durante la congelación y almacenamiento. La actividad enzimática es lenta pero existente, por tal motivo es necesario aplicar un tratamiento térmico para desnaturalizar las enzimas previo a la congelación.

Para las dos enzimas, se determinaron las energías de activación (E_a) de las dos fracciones de isoenzimas, para este fin la ecuación de Arrhenius (Ec. 2-5) se introdujo en las Ecs. 2-2 y 2-4; y luego de aplicar logaritmo natural se obtuvieron las siguientes ecuaciones:

$$\ln(\%AE) = \ln(\alpha_R) - t \cdot k_{R_{REF}} \cdot \exp \frac{-E_{aR}(T_{REF}-T)}{R(T_{REF} \times T)} \quad (2-6)$$

$$\ln(\%AE - \alpha_R) = \ln(\alpha_L) - t \cdot k_{L_{REF}} \cdot \exp \frac{-E_{aL}(T_{REF}-T)}{R(T_{REF} \times T)} \quad (2-7)$$

Se utilizó el método sugerido por (Arabshahi y Lund, 1984) con el fin de obtener E_a y poder reportar estos valores con intervalos de confianza adecuados. Esta metodología aplica una regresión no lineal utilizando todos los valores de actividad de enzimática experimental (%AE) en función de las variables independientes que

son tiempo y temperatura. Comparado con la metodología tradicional donde la regresión se realiza con solo tres puntos (tres constantes a tres temperaturas), este método incrementa el número de grados de libertad, por lo tanto, se reduce la desviación estándar.

La E_a para la fracción térmicamente resistente se obtuvo por regresión no lineal de la Ec. 2-6 utilizando todos los datos experimentales obtenidos a diferentes temperaturas y tiempos de calentamiento. La variable dependiente fue $\ln(\%AE)$ y las variables independientes la temperatura y el tiempo. La E_a de la fracción lábil al calor se calculó por regresión no lineal de Ec. 2-7 donde $\ln(\%AE - \alpha_R)$ fue la variable dependiente. La fracción resistente al calor (α_R), $k_{R\text{ REF}}$ y $k_{L\text{ REF}}$ a 353 K se conoce partiendo de los parámetros previamente determinados.

La Tabla 2-5 muestra las E_a de las fracciones termo-resistentes y termo-lábiles de POD y LOX junto con el $\% \alpha_R$ para ambos vegetales. Según lo buscado en literatura no existen antecedentes bibliográficos con respecto a los parámetros cinéticos en la inactivación térmica de POD y LOX en repollitos de Bruselas.

Tabla 2-5 Energías de activación (E_a) de las fracción termo resistente (E_{aR}) y termo lábil (E_{aL}), y fracción de la isoenzima resistente (α_R). Los valores que se muestran son el resultado de las regresiones no-lineales de todos los valores experimentales con las correspondientes desviaciones estándar en paréntesis y el coeficiente de determinación (R^2)

Vegetal	Enzima	E_{aL} (kJ/mol)	R^2	E_{aR} (kJ/mol)	R^2	$\alpha_R\%$
Brócoli	POD	66.9(3.6) n=30	0.88	71.2(2.5) n=38	0.94	21.36 (1.03)
Repollito de Bruselas		62.5(1.9) n=30	0.97	56.3(3.0) n=38	0.92	25.02 (1.04)
Brócoli	LOX	34.6 (9.3) n=26	0.91	108.3 (5.0) n=36	0.85	27.66 (1.00)
Repollito de Bruselas		65.8 (4.5)	0.97	63.7 (2.8)	0.96	30.97 (1.03)

La α_R de ambas enzimas (LOX y POD) fue mayor en los repollitos de Bruselas a comparación del brócoli (Tabla 2-5). Para el brócoli, Morales-Blancas et al., (2002) informó $\% \alpha_R = 21.12$ para POD y 34.82 para LOX (Datos a 80°C) y Połata, Wilińska, Bryjak, y Polaković (2009) estimaron un $\% \alpha_R = 26.4$ para POD en brócoli. Comparando la E_a de la fracción lábil (E_{aL}) con la de la fracción resistente (E_{aR}) en el caso de brócoli es menor para las dos enzimas, en cambio para el repollito de

Bruselas este parámetro es mayor.

Con referencia a los valores de energía de activación, Sarikaya y Ozilgen (1991) reportaron $E_{aR}=104.3$ kJ/mol y $E_{aL} = 83.3$ kJ/mol para las fracciones resistentes y lábil de POD en papas, en el intervalo de temperatura entre 65 y 80°C. Güneş y Bayindirli (1993) informaron valores de E_a para POD en un rango de temperatura de 70-96°C de $E_{aL}=41.3$ kJ/mol, $E_{aR}=75.3$ kJ/mol en guisantes; en el caso de las judías verdes $E_{aL}=57.3$ kJ/mol, $E_{aR}=77.3$ kJ / mol, y para las zanahorias $E_{aL}=52.3$ kJ/mol, $E_{aR}=57$ kJ/mol. Wawire y col., (2016) obtenidos para el poroto africano $E_{aR}=109.67$ y $E_{aL}=256.9$ kJ / mol. Garrote y col., (2001) informaron $E_a=160.7$ kJ/mol para LOX en judías verdes cortadas. Morales-Blancas y col., (2002) publicaron valores similares a los obtenidos en el presente trabajo para POD ($E_{aR} = 58$ kJ/mol y $E_{aL} = 75$ kJ/ mol) y LOX ($E_{aR}=55$ kJ/mol y $E_{aL}=61$ kJ / mol) en brócoli. Anese y Sovrano (2006) informaron valores de energía de activación de LOX a 80 °C en extractos de tomate ($E_{aR} = 60.8$ kJ / mol y $E_{aL}= 147$ kJ / mol).

Todos los parámetros cinéticos que se determinaron para cada una de las dos fracciones térmicamente diferentes de las enzimas estudiadas sirven para determinar tiempos de proceso de industrialización de vegetales precocidos congelados. Estos datos cinéticos de inactivación enzimática son únicos para cada especie de vegetal y tiempo de cosecha siendo afectado también por las condiciones de cultivo (Kushad, Guidera, y Bratsch, 1999; Morales-Blancas y col., 2002; Vámos-Vigyázó y Haard, 1981), por lo tanto obtener información para cada una de las especies es importante debido a que ayuda a entender el grado de procesamiento térmico al cual debe someterse para llegar a un nivel de inactivación enzimática que no genere deterioro durante el almacenamiento congelado.

2.6. CONCLUSIONES PARCIALES

- Se determinó la composición proximal de los vegetales estudiados los cuales no difieren con valores de la USDA (2015). El factor de conversión de nitrógeno total a contenido de proteína usado es adecuado y permitió expresar la actividad enzimática con respecto al contenido total de enzima presente en los vegetales.
- Se midieron experimentalmente las actividades enzimáticas del proceso de inactivación térmica, permitiendo elaborar las curvas de inactivación enzimática en repollitos de Bruselas y brócoli para la POD y LOX detectando un comportamiento

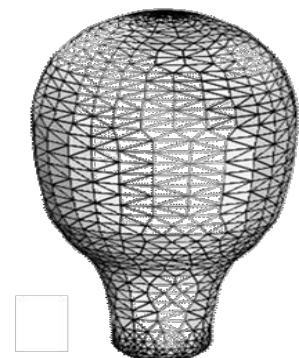
bifásico con presencia de dos fracciones térmicamente diferentes (fracción termo-lábil y termo-resistente).

- Se corroboró un comportamiento bifásico en brócoli, y en Repollitos se realizó un aporte en el área de cinéticas de inactivación enzimática ya que no existía literatura reportada de estos parámetros ni de la existencia de isoenzimas térmicamente lábiles y térmicamente resistentes.
- A partir de los porcentajes de actividad enzimática residual vs tiempo a distintas temperaturas se calculó para la POD y la LOX la energía de activación para cada tipo de isoenzima (fracción termo-lábil y termo-resistente), las fracciones iniciales de isoenzima resistente α_R , y las constantes cinéticas de reacción del proceso de inactivación térmica (k). Estos parámetros cinéticos se obtuvieron realizando técnicas estadísticas y regresiones no lineales según el método de Arabshahi y Lund, (1984) que permite una mayor precisión en los parámetros calculados.



CAPITULO 3

SIMULACIÓN DEL PRE-TRATAMIENTO TÉRMICO EN REPOLLITOS DE BRUSELAS (*BRASSICA OLERACEA L. GEMMIFERA*) ACOPLANDO LAS CINÉTICAS DE INACTIVACIÓN ENZIMÁTICA



3. SIMULACIÓN DEL PRE-TRATAMIENTO TÉRMICO EN REPOLLITOS DE BRUSELAS (*BRASSICA OLERACEA* L. *GEMMIFERA*) ACOPLANDO LAS CINÉTICAS DE INACTIVACIÓN ENZIMÁTICA

En el presente capítulo se realiza la simulación computacional del pre-tratamiento térmico en repollitos de Bruselas; se consideró el vegetal como un sólido de revolución con contorno irregular. Se utilizó en su resolución el Método de Elementos Finitos dado que se adapta satisfactoriamente a contornos y geometrías irregulares. Se acopló la cinética de inactivación enzimática determinada experimentalmente para las dos enzimas estudiadas a la simulación numérica del problema. Por último, se variaron las condiciones de procesamiento térmico para caracterizar diferentes atributos de calidad en repollitos de Bruselas pre-cocidos congelados.

3.1. OBJETIVOS DEL CAPITULO

- I. Utilizar modelos matemáticos para simular el proceso de transferencia de energía involucrado en el calentamiento y enfriamiento de repollitos de Bruselas considerando que el vegetal tiene una geometría bidimensional irregular axial simétrica.
- II. Determinar experimentalmente los coeficientes de transferencia calórica en la interfase en los sistemas estudiados durante el calentamiento en baño termostático con agitación y en un baño de enfriamiento agua-hielo. Verificar dichos coeficientes con correlaciones de literatura en base a números adimensionales como el Nusselt, Prandtl, Grashof, entre otros.
- III. Acoplar las cinéticas de inactivación enzimática de POD y LOX al programa principal de transferencia de energía para determinar la actividad enzimática residual a distintos tiempos de calentamiento a los efectos de optimizar el proceso.
- IV. Validar los modelos numéricos con resultados experimentales para las distintas etapas, correlacionado la temperatura y el tiempo del proceso térmico con la cantidad de actividad enzimática residual.
- V. Caracterizar diferentes parámetros de calidad (color, textura, contenido residual de ácido ascórbico) después del procesamiento térmico de los vegetales.

3.2. PROCESAMIENTO TÉRMICO Y SIMULACIÓN COMPUTACIONAL

El actual estilo de vida de las personas y la estacionalidad de la mayoría de los vegetales, conduce a la necesidad que exista una comercialización constante de productos semi o totalmente elaborados, a estos se les conoce como *ready to cook* o *ready to eat* (RTC y RTE por sus siglas en inglés).

Los pre-tratamientos térmicos para obtener vegetales pre-cocidos congelados involucran dos etapas: (i) la pre-cocción y (ii) un rápido enfriamiento para detener el proceso previo a la congelación. Estas dos etapas se deben optimizar tratando de lograr que las enzimas generadoras del deterioro del vegetal se inactiven, además de preservar buenas características de calidad tanto a nivel sensorial (textura, color) como nutricional (mantener en lo posible un alto contenido de bio-compuestos activos como el ácido ascórbico). En la Fig. 3-1 se muestran las diferentes etapas productivas que se realizan en la elaboración de vegetales pre-cocidos congelados.

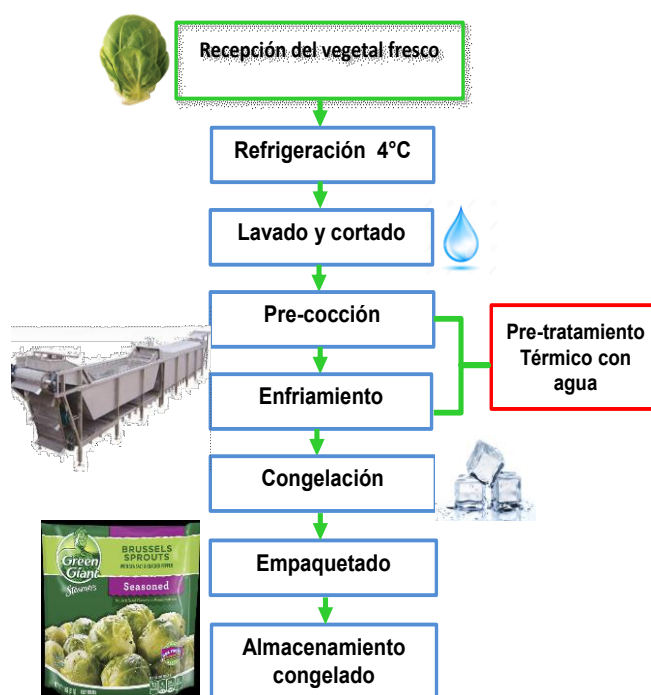


Fig. 3-1 Esquema para la producción de vegetales pre-cocidos congelados
(Barbosa-Cánovas, G y col., 2005)

3.3. MODELADO MATEMÁTICO

En la elaboración de productos pre-cocidos congelados es necesario cumplir varias etapas donde se efectúa un tratamiento térmico; las etapas se pueden describir

mediante fenómenos de transferencia de energía y requieren de la resolución matemática de las ecuaciones diferenciales de conducción de calor no estacionaria (Carslaw y Jaeger, 1959):

$$\rho C_p \frac{\partial T}{\partial t} = \nabla \cdot (k \nabla T) \quad (3-1)$$

Siendo ρ la densidad, C_p calor específico, k conductividad térmica, T la temperatura, y t el tiempo. En el caso de geometrías irregulares se requieren soluciones numéricas como las basadas en el método de los elementos finitos (MEF).

3.4. MÉTODO DE LOS ELEMENTOS FINITOS

En el MEF el dominio (Ω) se divide en pequeños elementos en cuyos vértices se ubican los nodos (discretización). Esto permite obtener una solución numérica aproximada sobre un cuerpo o dominio por lo cual se definen ciertas ecuaciones diferenciales en forma débil o integral que caracterizan el comportamiento físico del problema. El dominio se divide en un número elevado de subdominios no-intersectantes entre sí denominados elementos finitos. Dentro de cada elemento se distinguen una serie de puntos llamados nodos. El conjunto de nodos considerando sus relaciones de adyacencia se denomina malla.

La discretización del dominio continuo debe hacerse con elementos que mantengan lo mejor posible la figura irregular del dominio inicial y a medida que aumenta el refinamiento (aumentando el número de elementos) se mejora tanto el grado de aproximación del dominio como la solución numérica. A su vez se debe tener en cuenta que un excesivo refinamiento produce una acumulación de errores y mayor esfuerzo computacional, de modo que existe una relación de compromiso entre el grado de precisión del resultado numérico y tiempos de ejecución de máquina.

Una vez que se ha construido la malla por ejemplo con pequeños elementos triangulares en cuyos vértices se ubican los nodos, se procede a generar las funciones de interpolación o funciones base las cuales cumplirán estar definidas a trozos en cada elemento de la malla y ser suficientemente suaves. La solución aproximada en cualquier punto del dominio se obtiene a través de interpolaciones de polinomios que al ser evaluados en los nodos permitan que la solución numérica coincida con la solución en los nodos.

La temperatura en cualquier punto del dominio se obtiene a través de funciones de

interpolación y las temperaturas nodales (T_1 , T_2 , y T_3) del elemento que contiene a dicho punto (Ec. 3-2). Estas funciones de interpolación se las denomina funciones de forma (h_1 , h_2 , y h_3). (Fig. 3-2)

$$T = T_1 \cdot h_1 + T_2 \cdot h_2 + T_3 \cdot h_3 \quad (3-2)$$

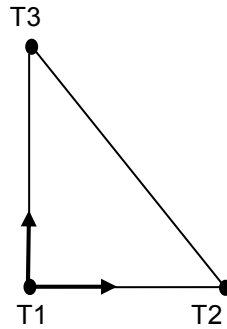


Fig. 3-2 Elemento bidimensional triangular en cuyos vértices se encuentran los nodos

3.5. PROBLEMAS DE TRANSFERENCIA DE CALOR SIN CAMBIO DE FASE (PROBLEMAS LINEALES)

La ecuación general que representa la conducción de energía en estado no estacionario en dos dimensiones es:

$$\rho C_p \frac{\partial T}{\partial t} = k \left(\frac{\partial^2 T}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 T}{\partial y^2} \right) \text{ en } \Omega \quad (3-3)$$

Esta ecuación es válida en el dominio Ω siendo T la temperatura, t el tiempo de proceso, ρ la densidad, k la conductividad térmica y C_p el calor específico del material, x e y son las coordenadas cartesianas. Para resolver Ec. 3.3 se define como condición inicial:

$$T = T_0 \quad t = 0 \quad \text{en} \quad \Omega \quad (3-4)$$

El problema puede tener condiciones de contorno de temperatura prescrita (3-5) y/o de transferencia convectiva (3-6) :

$$T = T_1 \quad t \geq 0 \quad \text{en } \delta\Omega_2 \quad (3-5)$$

$$-k(\nabla T \cdot n) = -k\left(\frac{\partial T}{\partial x} \cdot n_x + \frac{\partial T}{\partial y} \cdot n_y\right) = h(T - T_{\text{ext}}) \quad t \geq 0 \text{ en } \delta\Omega_1 \quad (3-6)$$

Cabe aclarar que Ω es el dominio y $\delta\Omega$ es la curva que representa el borde externo del dominio. En primer lugar para construir la formulación variacional del problema es necesario definir el residuo (ε) como:

$$\varepsilon(x, y) = \rho C_p \left(\frac{\partial^2 T}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 T}{\partial y^2} \right) \quad (3-7)$$

El residuo se construye con la aproximación de T de tal forma que ε sea lo menor posible. Luego se multiplica el residuo por una función de prueba v , la cual debe cumplir que el producto εv sea suave y que su integral en todo el dominio sea cero. Por ende se obtiene la siguiente ecuación:

$$\int_{\Omega} v \cdot \varepsilon(x, y) d\Omega = \int_{\Omega} v \cdot \rho C_p \frac{\partial T}{\partial t} d\Omega - \int_{\Omega} v \cdot k \left(\frac{\partial^2 T}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 T}{\partial y^2} \right) d\Omega = 0 \quad (3-8)$$

En la ecuación 3-8 el término $\int_{\Omega} v \cdot k \left(\frac{\partial^2 T}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 T}{\partial y^2} \right) d\Omega$ se puede desdoblar teniendo en cuenta la regla de la derivación. En el caso que se parte de la expresión:

$$\nabla \cdot (vk \nabla T) = k \nabla T \cdot \nabla v + v \nabla \cdot (k \nabla T) \quad (3-9)$$

donde ∇T es el vector gradiente:

$$\nabla T = \left(\frac{\partial T}{\partial x}, \frac{\partial T}{\partial y} \right) \quad (3-10)$$

Si se considera k isotrópico en todo el dominio e independiente de T se obtiene: $v \nabla \cdot (k \nabla T) = vk(\nabla^2 T)$, por lo tanto se puede desdoblar este término utilizando la siguiente ecuación:

$$vk(\nabla^2 T) = \nabla \cdot (vk \nabla T) - k \nabla T \cdot \nabla v \quad (3-11)$$

donde

$$\nabla^2 T = \left(\frac{\partial^2 T}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 T}{\partial y^2} \right) \quad (3-12)$$

resultando en la Ec. 3-8:

$$\int_{\Omega} v \cdot \rho C_p \frac{\partial T}{\partial t} d\Omega - \int_{\Omega} \nabla \cdot (vk \nabla T) d\Omega + \int_{\Omega} k \nabla T \cdot \nabla v d\Omega = 0 \quad (3-13)$$

El segundo término de la ecuación 3-13 se puede transformar en una integral de borde mediante el teorema de la divergencia (Ec. 3-14):

$$\int_{\Omega} \nabla \cdot \sigma d\Omega = \int_{\delta\Omega} \sigma \cdot n d\delta\Omega \quad (3-14)$$

siendo σ en este caso $vk \nabla T$, la Ec. 3-13 se expresa como:

$$\int_{\Omega} v \cdot \rho C_p \frac{\partial T}{\partial t} d\Omega - \int_{\Omega} vk \cdot (\nabla T \cdot n) d\delta\Omega + \int_{\Omega} k \nabla T \cdot \nabla v d\Omega = 0 \quad (3-15)$$

Sustituyendo las condiciones de borde en la integral sobre $\delta\Omega$:

$$\int_{\Omega} v \cdot \rho C_p \frac{\partial T}{\partial t} d\Omega + \int_{\delta\Omega_1} vh(T - T_{ext}) d\delta\Omega_1 + \int_{\Omega} k \nabla T \cdot \nabla v d\Omega = 0 \quad (3-16)$$

Por lo tanto el problema planteado corresponde a encontrar una función T que cumpla para cualquier función de prueba v admisible la siguiente ecuación:

$$\int_{\Omega} v \cdot \rho C_p \frac{\partial T}{\partial t} d\Omega + \int_{\delta\Omega_1} vhT d\delta\Omega_1 + \int_{\Omega} k \nabla T \cdot \nabla v d\Omega = \int_{\delta\Omega_1} vhT_{ext} d\delta\Omega_1 \quad (3-17)$$

Teniendo en cuenta la discretización del dominio (Zienkiewicz y Taylor, 1994), la Ec.3-17 puede describirse como:

$$\left[\sum_e \int_{\Omega_e} H^t \rho C_p H d\Omega_e \right] \dot{T} + \left\{ \sum_{e1} \int_{\delta\Omega_{e1}} H^t h H d\delta\Omega_{e1} + \sum_e \int_{\Omega_e} B^t k B d\Omega_e \right\} T = \left[\sum_{e1} \int_{\delta\Omega_{e1}} H^t h T_{ext} d\delta\Omega_{e1} \right] \quad (3-18)$$

donde

$CG = \sum_e \int_{\Omega_e} H^t \rho C_p H d\Omega_e$	es la matriz global de capacitancia
$KG = \sum_{e1} \int_{\delta\Omega_{e1}} H^t h H d\delta\Omega_{e1} + \sum_e \int_{\Omega_e} B^t k B d\Omega_e$	es la matriz global de conductancia
$FG = \sum_{e1} \int_{\delta\Omega_{e1}} H^t h T_{ext} d\delta\Omega_{e1}$	es el vector de fuerzas globales

$$H = [h_1 \ h_2 \ h_3]$$

$$H^t = \begin{bmatrix} h_1 \\ h_2 \\ h_3 \end{bmatrix}$$

$$T = [T_1 \ T_2 \ T_3]$$

$$B = \begin{bmatrix} h_{1x} & h_{2x} & h_{3x} \\ h_{1y} & h_{2y} & h_{3y} \end{bmatrix} \text{ donde } h_{ix} = \frac{\partial h_i}{\partial x} \text{ y } h_{iy} = \frac{\partial h_i}{\partial y} \text{ para } i=1,2,3$$

El símbolo \sum_e en cada una de las matrices globales CG, KG y el vector FG representa el cálculo de las integrales en cada elemento de la malla y su borde, para luego ser ensamblado en una matriz global según la numeración establecida de los nodos y elementos de la malla. El sistema semi-discreto de ecuaciones diferenciales ordinarias a resolver, (Ec. 3.19) se puede escribir de manera más compacta y simple en forma matricial como:

$$CG \cdot \dot{T} + KG \cdot T = FG \quad (3-19)$$

3.6. SIMULACIÓN DEL PROCESO USANDO COMSOL MULTIPHYSICS

La simulación computacional se realizó por medio de la Metodología de Elementos Finitos, para esto se usó el software COMSOL Multiphysics 3.5a debido a que esta plataforma permite resolver ecuaciones diferenciales a derivadas parciales.

El módulo seleccionado para simular el pre-tratamiento térmico en los repollitos de Bruselas fue el *Heat Transfer*; este módulo resuelve problemas que involucran cualquier combinación de fenómenos de conducción, convección y radiación. Además se ha planteado la resolución del problema mediante un modelo de simetría axial en dos dimensiones (2D) con contorno irregular.

Se uso de esté software permite simular los perfiles de temperatura en función del tiempo en los procesos de transferencia de calor que el vegetal experimenta en etapas consecutivas: a) baño calefactor (pre-cocción); b) enfriamiento en un baño agua/hielo. El módulo permite cargar parámetros propios de la situación estudiada, dentro de estos se encuentra el calor específico (Cp) del vegetal, los coeficientes de transferencia (h) de calor en la interfase, la conductividad térmica (k) y densidad del

dominio (ρ).

3.7. MATERIALES Y MÉTODOS

3.7.1. Formulación en elementos finitos del problema lineal acoplando las cinéticas de inactivación

El modelado matemático utilizando el software COMSOL Multiphysics 3.5a sigue el esquema de la Fig. 3-3.

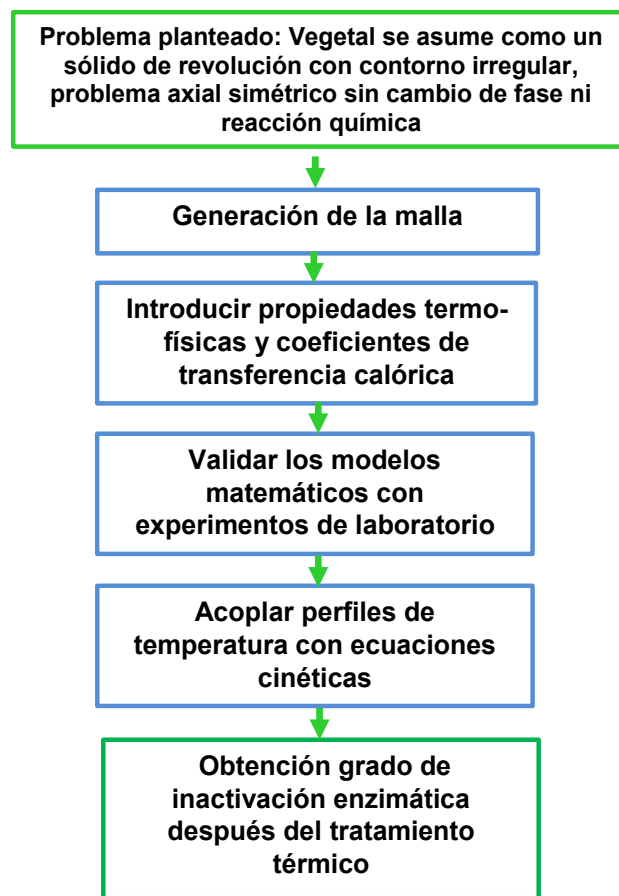


Fig. 3-3 Esquema general de trabajo para la simulación del procesamiento térmico

3.7.2. Generación de la malla y determinación del contorno irregular

Para la simulación computacional se usaron repollitos de Bruselas con las siguientes imensiones: diámetro 36.5 mm (Desviación Estándar; DE=2.2 mm) y altura 37.8 mm (DE=3.2 mm). El vegetal fue considerado como un sólido de revolución cuyo contorno irregular se obtuvo a través de imágenes digitales. Las imágenes fueron editadas para crear el contorno irregular usando el software Photofiltre 7. Una vez obtenida las imágenes editadas, estas fueron importadas al mallador para la

discretización de los objetos en elementos triangulares.

La ecuación diferencial que gobierna la transferencia de energía en coordenadas cilíndricas para un problema axial simétrico se puede expresar de la siguiente manera cuando las propiedades termofísicas son constantes:

$$\rho C_p \frac{\partial T}{\partial t} r = \frac{\partial}{\partial r} \left(k r \frac{\partial T}{\partial r} \right) + \frac{\partial}{\partial z} \left(k r \frac{\partial T}{\partial z} \right) \quad (3.20)$$

Esta ecuación es válida en el dominio Ω siendo T la temperatura, t el tiempo del proceso de proceso, ρ la densidad, k la conductividad térmica, C_p el calor específico del material, r y z las coordenadas geométricas.

Las condiciones iniciales y de contorno son las siguientes:

$$T = T_0 \quad t = 0 \quad \text{en } \Omega \quad (3.21)$$

$$\left(\frac{\partial T}{\partial z} \cdot n_z + \frac{\partial T}{\partial r} \cdot n_r \right) k = h (T_{\text{ext}} - T) \quad t \geq 0 \quad \text{en } \partial \Omega_1 \quad (3.22)$$

$$\left(\frac{\partial T}{\partial z} \cdot n_z + \frac{\partial T}{\partial r} \cdot n_r \right) k = 0 \quad t \geq 0 \quad \text{en } \partial \Omega_2 \quad (3.23)$$

En la Fig. 3-4 se ejemplifica para el repollito el dominio Ω de la ecuación diferencial para el cuerpo de revolución; $\partial \Omega_1$ corresponde a la interfase convectiva y $\partial \Omega_2$ al eje de simetría, T_{ext} es la temperatura del fluido externo (medio calefactor o baño de enfriamiento), T_0 la temperatura inicial, $n=(n_r, n_z)$ es el versor normal unitario exterior a la superficie, y h el coeficiente de transferencia de calor.

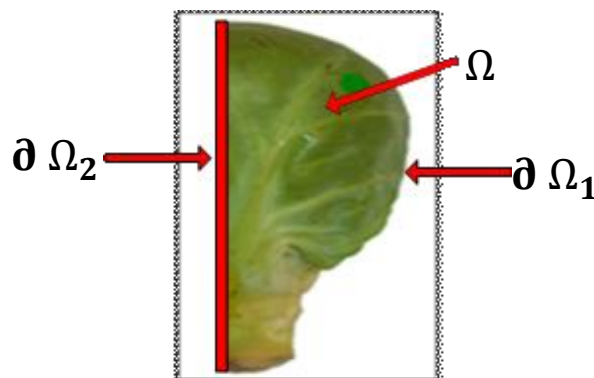


Fig. 3-4 Dominio de validez de la ecuación diferencial e interfases involucradas

3.7.3. Determinación de las propiedades térmicas del Repollito de Bruselas y coeficientes de transferencia calórica

3.7.3.1. Calor específico

El calor específico (C_p) se define como el calor necesario para aumentar la temperatura de una unidad de masa de un alimento en un grado centígrado. El calor específico de los repollitos de Bruselas se midió por medio de Calorimetría Diferencial de barrido (DSC), en un DSC Modelo Q100 TA Instruments, (New Castle, Delaware, EE. UU) controlado por un módulo TA 5000 con un sistema de enfriamiento rápido bajo una atmósfera de nitrógeno en 20 ml/min. Las muestras se dispusieron en cápsulas de aluminio selladas. En este equipo se hicieron corridas de calentamiento a una velocidad de $2^\circ\text{C}/\text{min}$ desde -50°C hasta 100°C con un período isotérmico inicial de 10 minutos a -50°C .

Con el propósito de obtener el C_p se realizaron tres mediciones, las cuales consistieron en: (i) dos cápsulas vacías de igual peso para obtener una línea de base, (ii) una cápsula que contenía un estándar de zafiro para obtener su correspondiente termograma y (iii) la muestra del vegetal. El C_p se calculó siguiendo el procedimiento ASTM E1269 (2003) y las recomendaciones de McNaughton y Mortimer (1975). El procedimiento completo se realizó por triplicado. A modo de ejemplo la Fig. 3-5 se muestra esquemáticamente un termograma obtenido mediante DSC.

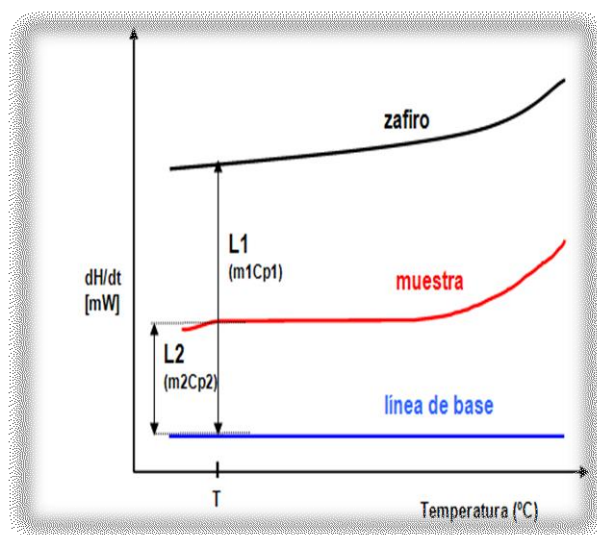


Fig. 3-5 Representación esquemática de termograma obtenido mediante DSC

A partir de la relación de las alturas $L1$ y $L2$ y la masa de la muestra y el zafiro se pudo calcular el C_p , esta relación se presenta en la Ec 3-24.

$$\frac{Cp2}{Cp1} = \frac{L2}{L1} \cdot \frac{m1}{m2} \quad (3-24)$$

3.7.3.2. Densidad del producto

Experimentalmente la densidad se determinó tomando repollitos de Bruselas, y midiendo la masa en una balanza analítica macar Mettler Toledo AB-204 (Suiza). Luego se sumergió el vegetal en una probeta con agua y se observó el volumen desplazado de agua; el volumen desplazado correspondía al volumen de la muestra. La densidad se determinó como la relación entre la masa y volumen del vegetal. Esto se realizó por triplicado.

Asimismo considerando que el vegetal contiene aire se determinó la porosidad utilizando las siguientes ecuaciones.

La densidad de la matriz sólida se obtuvo utilizando el modelo propuesto por Choi y Okos (1983):

$$\rho_s(T) = \frac{1}{\sum \frac{x_i}{\rho_i}} \quad (3-25)$$

donde $\rho_s(T)$ es la densidad del sólido y ρ_i es la densidad del componente i , donde i (agua, carbohidratos, cenizas, lípidos, proteínas) Las fracción " x_i " corresponde a la fracción másica de cada componente. Choi y Okos (1986) propusieron las siguientes expresiones para determinar la densidad de cada componente:

$$\rho_{\text{agua}} = 997.18 + 3.1439 \times 10^{-3}T - 3.7574 \times 10^{-3}T^2$$

$$\rho_{\text{carbohidratos}} = 1599.1 - 0.31046T$$

$$\rho_{\text{proteína}} = 1330 - 0.5184T$$

$$\rho_{\text{grasa}} = 925.59 - 0.41757T$$

$$\rho_{\text{ceniza}} = 2423.8 - 0.28063T$$

donde las densidades (ρ) están expresadas en kg/m^3 y las temperaturas (T) en $^{\circ}\text{C}$ variando entre -40 and 150°C .

En productos porosos con porosidad ε (Volumen aire/Volumen total), la densidad se describe mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{(1-\varepsilon)}{\rho} = \sum_{i=1}^n \frac{x_i}{\rho_i} = \frac{1}{\rho_s} \quad (3-26)$$

donde: ρ es la densidad global del alimento que contiene aire ρ_i es la densidad de cada componente i (agua, carbohidratos, cenizas, proteínas y lípidos).

3.7.3.3. Conductividad Térmica

La conductividad térmica de la matriz sólida continua k_c (sin considerar el aire) del repollito de Bruselas se estimó utilizando la ecuación descripta por (Choi y Okos, 1986):

$$k_c(T) = \sum x_i^v \cdot k_i(T) \quad (3-27)$$

donde k_c es la conductividad de sólido continuo, k_i es la conductividad térmica del componente i correspondiente a la composición proximal del vegetal (agua, carbohidratos cenizas lípidos y proteínas, etc.); x_i^v corresponde a la fracción volumétrica de cada componente.

Para calcular las k de cada componente se utilizaron las siguientes expresiones en función de T (°C)

$$\begin{aligned} k_{\text{agua}} &= 0.57109 + 1.7625 \times 10^{-3}T - 6.7036 \times 10^{-6}T^2 \\ k_{\text{carbohidratos}} &= 0.20141 + 1.3874 \times 10^{-3}T - 4.3312 \times 10^{-6}T^2 \\ k_{\text{proteína}} &= 0.17881 + 1.1958 \times 10^{-3}T - 2.7178 \times 10^{-6}T^2 \\ k_{\text{grasa}} &= 0.18071 - 2.7604 \times 10^{-3}T - 1.7749 \times 10^{-7}T^2 \\ k_{\text{ceniza}} &= 0.32961 + 1.4011 \times 10^{-3}T - 2.9069 \times 10^{-6}T^2 \end{aligned}$$

Para el cálculo de la conductividad térmica del alimento conteniendo aire (k) se utilizó la ecuación de Maxwell Eucken considerando al aire como la fase dispersa en la matriz sólida continua:

$$k = k_c \left(\frac{2k_c + k_d - 2\varepsilon(k_c - k_d)}{2k_c + k_d + \varepsilon(k_c - k_d)} \right) \quad (3-28)$$

siendo k_c la conductividad del sólido previamente calculada con Choi y Okos y k_d es la conductividad del aire y ε la porosidad.

3.7.3.4. Determinación de los Coeficientes de transferencia de calor en la interfase (h)

Los coeficientes de transferencia de calor en cada etapa del pre-tratamiento térmico (pre-cocción y enfriamiento) se determinaron experimentalmente y además se usaron correlaciones en función de números adimensionales para su estimación. Estos valores de h fueron incorporados en el modelo numérico. Con el coeficiente de transferencia de calor en interfase (h [$\text{W/m}^2 \text{ } ^\circ\text{C}$]) se pueden conocer las condiciones de transferencia de energía sobre la superficie expuesta del alimento y el medio externo que lo rodea.

Existen varios factores que intervienen en los procesos de transferencia de calor, estos son: la velocidad del fluido externo, la geometría del alimento, las características de la superficie expuesta del alimento, entre otros. El coeficiente de transferencia (h) que tiene en cuenta los factores mencionados se define como:

$$q = h(T_s - T_{\text{ext}}) \quad (3-29)$$

donde q es el flujo de calor (energía por unidad de área y tiempo), T_s es la temperatura en la superficie y T_{ext} es la temperatura del fluido externo.

El pre-tratamiento térmico del vegetal se realizó en dos etapas consecutivas (Fig. 3-6) calentamiento y enfriamiento. Para la etapa de calentamiento se usó un baño termostático con agitación interna Techne modelo FTE-10DDC (Bibby-scientific Ltda, Stone Staffordshire, Reino Unido) y para el enfriamiento un baño frío agua/hielo.



Fig. 3-6. Baño termostático y agua/hielo usados en las experiencias

Para estimar el coeficiente de transferencia en las distintas etapas se usó una esfera de aluminio la cual tiene las siguientes propiedades:

- $R = 0.025 \text{ m}$
- $k = 178.35 \text{ W/m}^\circ\text{C}$
- $\rho = 2700 \text{ Kg/m}^3$
- $C_p = 908.53 \text{ J/Kg } ^\circ\text{C}$

Experimentalmente se sumergió la esfera en el baño termostático durante un tiempo determinado, luego de esto se colocó en un baño frío (agua/hielo). Se registró la temperatura en el centro y en el seno de los fluidos en función del tiempo utilizando un sistema de adquisición (TESTO175, TESTO AG, Alemania); los experimentos se realizaron por triplicado.

Para obtener experimentalmente los valores de h en el experimento con la esfera de aluminio se utilizó el método de “lumped parameters” que se basa en la resolución de la siguiente ecuación diferencial que considera que la resistencia interna a la transferencia de energía dentro de la esfera es despreciable por ser el aluminio un metal altamente conductor.

$$\rho C_p V \frac{dT}{dt} = hA (T_s - T_\infty) \quad (3-30)$$

La solución analítica de esta ecuación es:

$$\frac{T - T_\infty}{T_i - T_\infty} = \exp \left[\frac{-hA t}{\rho V C_p} \right] \quad (3-31)$$

siendo T_i la temperatura inicial de la esfera.

Regresionando el logaritmo natural de las temperaturas experimentales adimensionales en función del tiempo, a partir de la pendiente se obtuvieron los valores de h . Además los coeficientes de transferencia de calor en la interfase alimento-fluido se calcularon utilizando correlaciones en convección forzada para esferas durante el calentamiento en función de los siguientes números adimensionales:

- Reynolds: $Re = \frac{\rho v D}{\mu} \quad (3-32)$

- Nusselt: $Nu = \frac{hD}{k} \quad (3-33)$

- Prandtl: $Pr = \frac{C_p \mu}{k} \quad (3-34)$

donde h = coeficiente de transferencia de calor (W/m^2K) ; D = diámetro (m); k = conductividad térmica del fluido externo (agua) ($W/m.K$) ; ρ = densidad del fluido (Kg/m^3); v = velocidad del fluido (m/s); μ =viscosidad del fluido ($Kg/m.s$); C_p = calor específico ($J/Kg.K$). Para el enfriamiento se usaron correlaciones de convección natural donde el número Nu , es función del número de Grashof y del Prandtl, siendo:

$$\text{Grashof } Gr = \frac{D^3 \rho^2 g \beta \Delta T}{\mu^2} \quad (3-35)$$

Con β = el coeficiente de expansión volumétrica del fluido (K^{-1})

3.7.4. Validación experimental del modelo numérico durante el calentamiento y enfriamiento de los vegetales.

Para realizar la validación experimental de las soluciones numéricas de transferencia de calor (evolución de la temperatura en función del tiempo) usando COMSOL se realizaron ensayos experimentales de calentamiento y de enfriamiento de los vegetales. Para el calentamiento se sumergieron repollitos de Bruselas con un diámetro medio de 36.5 mm (Desviación Estándar; $DE=2.2$ mm) y altura media $=37.8$ cm ($DE=3.2$ mm) en un baño termostático con agitación interna Techne modelo FTE-10DDC (Bibby-scientific Ltda, Stone Staffordshire, Reino Unido).

Se registraron las temperaturas usando termocuplas conectadas a un adquisidor Testo 175 (Testo AG, Alemania) (Fig.3.7). Una de las termocuplas se ubicó en una posición axial de aproximadamente 2 cm desde el borde superior, próximo al centro geométrico del vegetal. Las experiencias se daban por finalizadas cuando se alcanzaba el equilibrio térmico con la temperatura del baño termostático. Luego del calentamiento el vegetal se enfriaba sumergiéndolo en un baño agua hielo



Fig. 3-7 Repollito de Bruselas con termocupla insertada y conectada al adquisidor Testo 175

Se determinó el desvío estándar promedio (root mean square error= RMSE) usando la Ec. 3-26. con el fin de estimar el grado de concordancia del modelo a los datos experimentales .

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum(T_{exp}-T_{pred})^2}{N}} \quad (3-36)$$

donde N es el número de datos, T_{exp} =temperatura experimental y T_{pred} = temperatura predicha por la solución numérica.

3.7.5. Aplicación del modelo numérico desarrollado para predecir tiempo de procesamiento y actividad enzimática residual

Como se demostró en el Capítulo 2, la inactivación enzimática de la peroxidasa (POD) y la lipoxigenasa (LOX) se caracterizó por presentar un comportamiento bifásico de primer orden por lo tanto se usó el modelo de Ling y Lund (1978). La velocidad de inactivación de cada isoenzima (fracción lábil y resistente) puede escribirse como:

$$\frac{dC_L}{dt} = -k_L \cdot C_{oL} \quad (3-37)$$

$$\frac{dC_R}{dt} = -k_R \cdot C_{oR} \quad (3-38)$$

donde C_{oL} y C_{oR} son la concentración inicial de enzima lábil y resistente respectivamente expresadas en unidades de actividad enzimática (AE/g seco) y k_L y k_R son las constantes de inactivación de la fracciones lábil y resistente. La concentración de enzima a $t=0$ y a un tiempo t durante el tratamiento térmico se escribe como:

$$C_0 = C_{oR} + C_{oL} \quad (3-40)$$

$$C = C_R + C_L \quad (3-41)$$

donde C_{oL} y C_{oR} son la concentración inicial de enzima lábil y resistente, respectivamente.

$$\frac{C}{C_0} = \frac{C_R+C_L}{C_{oR}+C_{oL}} = \frac{C_L}{C_{oR}+C_{oL}} + \frac{C_R}{C_{oR}+C_{oL}} \quad (3-42)$$

$$\frac{C}{C_o} = \left(\frac{C_L}{C_{oL}} \right) \frac{C_{oL}}{C_{oR} + C_{oL}} + \left(\frac{C_R}{C_{oR}} \right) \frac{C_{oR}}{C_{oR} + C_{oL}} \quad (3-43)$$

Luego :

$$\frac{C}{C_o} = \left(\frac{C_L}{C_{oL}} \right) \alpha + \left(\frac{C_R}{C_{oR}} \right) (1 - \alpha) \quad (3-44)$$

siendo $\alpha = C_{oL}/(C_o)$, la fracción lábil de enzima con respecto a la concentración inicial total de enzima en el alimento.

Se integraron las ecuaciones que describen la concentración residual de las dos isoenzimas teniendo en cuenta la temperatura en función del tiempo. para una posición definida dentro del alimento $T(r,z,t)$ obteniendo:

$$\frac{C_L}{C_{oL}} = \exp(-k_{LREF} \int_0^{tp} \exp \left(\frac{E_{aL}}{R} \left[\frac{1}{T(r,z,t)} - \frac{1}{T_{REF}} \right] \right) dt) \quad (3-45)$$

$$\frac{C_R}{C_{oR}} = \exp(-k_{RREF} \int_0^{tp} \exp \left(\frac{E_{aR}}{R} \left[\frac{1}{T(r,z,t)} - \frac{1}{T_{REF}} \right] \right) dt) \quad (3-46)$$

La concentración media de cada isoenzima a cada tiempo se calculó integrando en el volumen del vegetal de acuerdo con:

$$\overline{C_L} = \frac{\int_V C_L(r,z,t) dV}{\int_V dV} \quad (3-47)$$

$$\overline{C_R} = \frac{\int_V C_R(r,z,t) dV}{\int_V dV} \quad (3-48)$$

Además se cumple que en promedio en todo el alimento la concentración media total es:

$$\overline{C} = \overline{C_R} + \overline{C_L} \quad (3-49)$$

De esta manera es posible estimar la concentración media de las enzimas en todo el vegetal, es decir de la fracción lábil, resistente y total en el alimento. Las integrales involucradas en cada etapa se evaluaron numéricamente; para integrar en el tiempo se utilizó la regla del trapecio y para la integral de volumen se utilizó la regla de cuadratura para triángulos.

3.7.6. Variación de parámetros de calidad después del pre-tratamiento térmico y el enfriamiento

Con el fin de caracterizar los repollitos de Bruselas después del pre-tratamiento térmico (pre-cocción) e inmersión en baño agua/hielo, se determinaron varios parámetros de calidad en diferentes muestras vegetales variando el tiempo de tratamiento.

Se cuantificó experimentalmente el porcentaje de Actividad Enzimática Residual (%AE) para correlacionar estos resultados con los predichos por la simulación numérica que acopla la transferencia de energía y las cinéticas de inactivación enzimática.

Se seleccionaron muestras del vegetal con un tamaño uniforme; el peso promedio de los repollitos fue de 17.8 g (DE=0.9g), y sus dimensiones promedio fueron: diámetro= 30.1 mm (DE=1.1 mm) y altura 44.2 mm (DE=1.0 mm). La pre-cocción de los repollitos de Bruselas se llevó a cabo en un baño termostático de agua con agitación Techne Modelo FTE-10DDC (Bibby-científica Ltda, Stone Staffordshire, Reino Unido) a 90 °C. Las muestras se retiraron del baño a los 3, 6 y 10 minutos e inmediatamente se sumergieron en un baño de agua/hielo.

Se realizó la determinación de la actividad enzimática para la peroxidasa (POD) y lipoxigenasa (LOX), concentración de ácido ascórbico y parámetros de calidad (Color y textura) de las muestras de los repollitos frescos (VF) y después del pre-tratamiento térmico (VP). Para todos los parámetros menos la textura se obtuvo datos tanto del interior del repollito (zona apical) como para la parte exterior (zona exterior).

3.7.6.1. Actividad enzimática residual

El % de actividad enzimática de LOX y POD del repollito de Bruselas fresco, y después del tratamiento térmico a cada tiempo de tratamiento se determinaron en la zona apical y las capas externas de los vegetales tal como se explica en la sección 2.4.3 utilizando un número de muestras $n = 6$.

3.7.6.2. Color

La apariencia es un atributo importante en el cual el comprador basa su decisión de consumo en un producto. Una de las características de este atributo es el color ya que el procesamiento como los tratamiento térmicos genera cambios en el color,

este parámetro depende del grado de estabilidad de los pigmentos presentes y de los posibles cambios químicos que pueden desarrollarse (DeMan, 1999).

Los cambios de color de los repollitos de Bruselas fueron determinados usando un colorímetro Konica Minolta CR-400 (Osaka, Japón) calibrado con una placa blanca estándar ($Y=93.2$, $x=0.3133$, $y=0.3192$). Existen muchas coordenadas colorimétricas para analizar la variación del color, tales coordenadas sitúan cada color en un espacio determinado, que tendrá tantas dimensiones como número de coordenadas se necesiten; por lo tanto cada grupo de coordenadas genera un espacio de color, normalmente de tres dimensiones. Como la representación espacial sobre el plano de papel no es fácil, se sustituye entonces por representaciones geométricas planas llamadas diagramas cromáticos. Se utilizó el espacio CIELab, que se define con magnitudes colorimétricas a partir de valores triestímulo. El espacio de color CIELab es un sistema (Fig.3-8) definido por tres coordenadas colorimétricas L^* , a^* , b^* ; éstas son magnitudes adimensionales que describen como:

- L^* "Luminosidad": 100 para el blanco y 0 para el negro.
- a^* : describe el cambio de color de rojo ($+a^*$) a verde ($-a^*$)
- b^* : describe el cambio de color de amarillo ($+b^*$) a azul ($-b^*$)

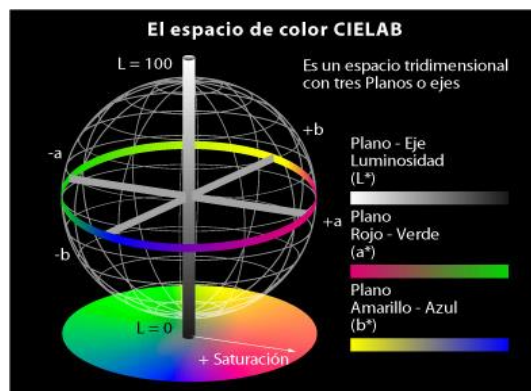


Fig. 3-8 Esquema representativo de los atributos de color: luminosidad y parámetros de cromaticidad a^* y b^* del espacio CIELab

A partir de estos parámetros de la escala CIELab se pueden calcular coordenadas de tipo polar como el ángulo hue (h°); este varía entre 0° y 360° y para estímulos acromáticos ($a^* = 0$, $b^* = 0$) es una magnitud no definida. El h° va desde 0° (rojo) hasta 60° (amarillo), 120° (verde), 240° (azul). Cuando $a < 0$ y $b > 0$ se calcula con la

Ec.3-50, por el contrario cuando a y $b > 0$ se calcula con la Ec.3-51.

$$h^{\circ} = 180 + \tan^{-1}\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \quad (3-50)$$

$$h^{\circ} = 180 - \tan^{-1}\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \quad (3-51)$$

La diferencia de color (ΔE) se calculó con respecto a los parámetros mencionados (L^* , a^* y b^*) medidos de los repollitos según la Ec.3-52.

$$\Delta E = \sqrt{(L^* - L_0^*)^2 + (a^* - a_0^*)^2 + (b^* - b_0^*)^2} \quad (3-52)$$

donde L_0^* , a_0^* y b_0^* son parámetros correspondientes a los medidos del vegetal sin tratamiento térmico.

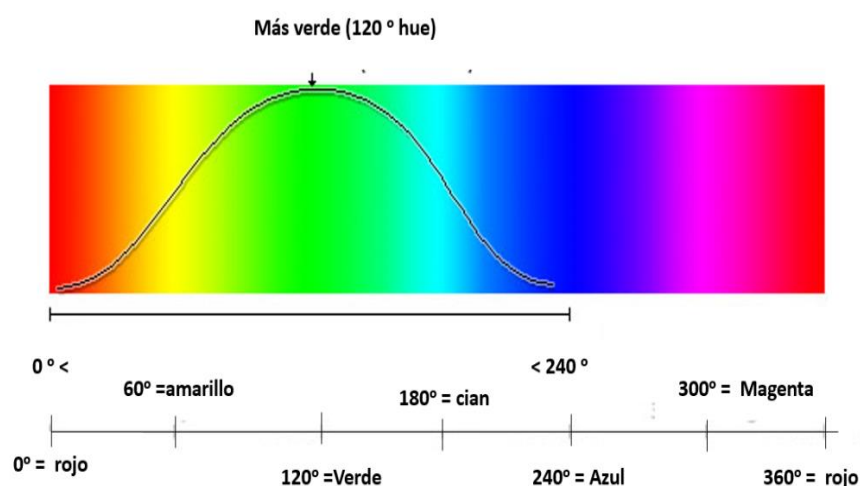


Fig. 3-9 Grafica de la variación de h°

3.7.6.3. Textura

La textura es uno de los atributos primarios que conforman la calidad sensorial de los alimentos y es el resultado de la acción de estímulos de distinta naturaleza, ya sean mecano-receptores, táctiles y en ciertos casos auditivos y visuales sobre la estructura de un alimento. Es un atributo importante de calidad que influye en los hábitos alimentarios, y la preferencia del consumidor; en el procesamiento y manipulación de alimentos, puede tomarse como índice de calidad o deterioro.

La importancia de la textura en la calidad total varía ampliamente en función del tipo de alimento (Castro-Montero y Hombre-Morgado, 2007). La medida de textura depende principalmente de la percepción de la respuesta del alimento cuando

actúan sobre él determinadas fuerzas durante la masticación previa a la ingestión (Szczesniak, 2002). En frutas y hortalizas la textura es función de la estructura de los tejidos, del contenido de agua, la turgencia de las células y la composición de la pared celular (Zapata y col, 210).

La determinación de los parámetros de textura se realizó efectuando un ensayo de penetración. La fuerza de penetración se define como la fuerza necesaria o requerida para penetrar un producto en un tiempo determinado (Lewis, 1993). A partir de los parámetros de textura obtenidos de los ensayos de penetración se puede obtener los siguientes parámetros:

- Fuerza máxima: Se define como el valor de la fuerza medido en Newton (N) necesaria para producir la fractura de la superficie del objeto a analizar, por lo tanto se llama punto de ruptura. Con este parámetro se determina la firmeza (Olivera y col., 2008).
- Pendiente en la curva fuerza-deformación: Este parámetro se conoce como coeficiente de elasticidad y corresponde a la pendiente de la curva de fuerza vs distancia; se mide en N/mm desde el origen al punto de ruptura o fuerza máxima. Objetos más rígidos generan pendientes mayores dado que se necesita mayor fuerza para provocar la deformación (Vargas y col., 2000; Nguyen y col., 2010).

Las mediciones se realizaron con un mínimo de 6 muestras vegetales. Para el ensayo de punción se utilizó texturómetro TA.XT2i – Stable Micro Systems (Surrey, Inglaterra); se empleó el programa Texture Expert para Windows (v.1.2) para analizar el comportamiento obtenido. Los ensayos de punción se realizaron con una Sonda P/2 cilíndrica de 2mm de diámetro. Los parámetros de ensayo fueron:

- Velocidad de pre-ensayo → 5 mm/s
- Velocidad de ensayo → 0.5 mm/s
- Velocidad de post-ensayo → 5 mm/s
- Distancia de penetración → 50 %
- Fuerza → 0.98 N



Fig. 3-10 Fotografía del montaje realizado para el ensayo de punción

3.7.6.4. Ácido ascórbico residual

Para determinar el contenido de ácido ascórbico en las muestras de repollito de Bruselas se procedió a realizar extractos vegetales. Se pesaron 0.6 g de la muestra del vegetal los cuales se mezclaron con 2.5 mL de una solución de ácido metafosfórico (HPO_3) 5%(p/v).

Las muestras se homogeneizaron a una temperatura de 4°C y una velocidad de 2000 rev/min durante 15 minutos usando una centrifuga (Rolco CM 2036, Argentina); luego se conservó el sobrenadante refrigerado a 4°C hasta su lectura. La determinación del contenido de ácido ascórbico se llevó a cabo en un Cromatógrafo HPLC Waters (Waters 1525 Binary HPLC Pump; Detector UV-Waters 2998). Se utilizó como fase móvil una solución isocrática de ácido metafosfórico al 0.5% (p/v) mezclada con acetonitrilo en una proporción de 93:7 respectivamente.

La curva de calibración se preparó con ácido ascórbico grado HPLC disuelto en la fase móvil. Los extractos y las soluciones con las que se preparó la curva de calibración se filtraron con membranas Millipore (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) de 0.45 μm antes de ser inyectadas en el equipo. El método utilizado se elaboró a partir de la metodología descrita por Kafkas y col.,(2006); Nojavan y col., (2008).

Las separaciones se llevaron a cabo con una columna RP-C₁₈ column 4.6x150 mm, 5 μm (Waters, Milford, MA, USA) y con un detector UV-Visible programado para leer a una longitud de onda de 245nm. El flujo utilizado fue de 1 ml/min y el volumen de inyección de 20 μL . La temperatura de la columna y el sistema se mantuvieron constantes a 25°C. La curva de calibración se obtuvo graficando el área obtenida para cada pico. Se usó del software Peakfit v.4. 12.00 (SeaSolve Software Inc,

Frammingham, MA, USA) en función de la cantidad de ascórbico presente, y se encontró que el comportamiento era lineal en el rango de 0.5 a 500 mg/l. Las concentraciones de ácido ascórbico en las muestras se determinaron analíticamente de la regresión lineal para la curva patrón.

3.7.7. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el software OriginPro 8 (Origin Corporation, Northampton, MA, EE.UU.) y SYSTAT 12.0 (Systat Software, Evanston, IL, EE.UU.). Las pruebas de comparación se determinaron por medio del test de diferencia mínima de Fisher (LSD) usando un 95% de nivel de confianza y un nivel de significancia de $P \leq 0.05$.

3.8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.8.1. Generación de la malla

El dominio simétrico axial bidimensional (Repollito de Bruselas) se construyó a partir de imágenes de la muestra (Figuras 3-11a). Estas imágenes fueron procesadas digitalmente para obtener una imagen binaria usando el software Photofiltre. El contorno de la imagen binaria se aproximó con una curva B-Spline, que se utilizó como base para la construcción del dominio de simulación. El dominio tridimensional se obtuvo por revolución de la imagen irregular bidimensional (Fig. 3-11 b). La malla triangular que se usó para discretizar los dominios correspondió a un total de 5391 puntos y 10272 elementos.

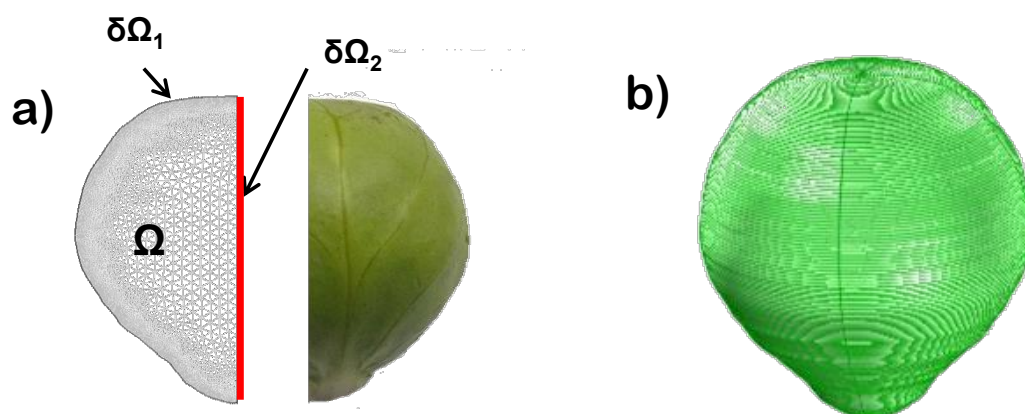


Fig. 3-11 a) Fotografía y curva de contorno usada para la generación del dominio axial simétrico 2D discretizado en elementos triangulares. b) Sólido en revolución de la geometría en 3D

La cinética de inactivación enzimática se acopló con la historia térmica del procesamiento térmico. Se creó un subdominio del objeto para simular la zona apical del vegetal (región interna correspondiente a la toma de muestra donde se midieron las actividades enzimáticas y los atributos de calidad) (Fig. 3-12).

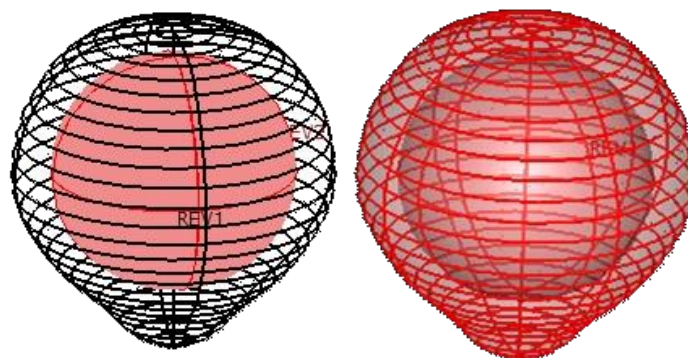


Fig. 3-12. Sub-dominio usado para simular la zona apical del vegetal

3.8.2. Densidad del vegetal y propiedades termofísicas

El valor experimental de la densidad del vegetal fue de $\rho=880 \text{ Kg/m}^3$. Para determinar la densidad del sólido (sin aire) se tuvieron en cuenta los resultados de la composición proximal reportados en la Tabla 2-2 (Capítulo 2), estos fueron: Humedad=83.54% (DE=0.55%), Proteínas=3.20% (DE=0.09%), Lípidos=0.36% (DE=0.02%), Cenizas=1.19% (DE=0.02%) y Carbohidratos 11.74%. La densidad del sólido calculada por la ec. 3.25 fue de 1050 Kg/m^3 .

Considerando el valor experimental de la densidad y aplicando la Ec. (3-25) se obtuvo un valor de porosidad de 16%.

La conductividad térmica de la matriz sólida continua k_c (sin considerar el aire) del repollito de Bruselas estimada por la Ec. (3.27) resultó de 0.55 W/m K . Utilizando la ecuación de Maxwell Eucken Ec. (3.28) con porosidad del 16% y conductividad térmica del aire a 50°C de 0.02735 W/m K se obtuvo un valor de $k= 0.50 \text{ W/m K}$ para el vegetal.

El calor específico aparente en función de la temperatura obtenida mediante DSC se muestra en la Fig.3-13a, a partir de estos valores se calculó el calor específico= $3.86 \times 10^3 \text{ J/Kg K}$ para una rango de temperaturas entre 1 y 95°C .

Los coeficientes de transferencia de calor para las etapas de: a) calentamiento de los vegetales en baño termostático con agitación (convección forzada) y enfriamiento

en baño agua-hielo (convección natural) fueron determinados utilizando en una primera etapa esferas de aluminio que ayudaron a calibrar el sistema (por ejemplo determinar adecuadamente la velocidad del fluido).

En el caso de calentamiento en baño temostático los valores medios de los coeficientes de transferencia obtenidos a partir de los datos experimentales y la Ec. 3-31 para las esferas de aluminio fueron de 2262 W/m²K (DE=285,02), además se utilizaron correlaciones de literatura (Earle, 1988; Nesvadba, 2008) para la estimación de coeficientes de transferencia en la interfase.

La ecuación utilizada en la etapa de calentamiento para esferas sumergidas en un fluido en condiciones convección forzada es la siguiente:

$$Nu = 2 + 0.6 Re^{1/2} Pr^{1/3} \quad (3-53)$$

En los experimentos de calentamiento de esferas de aluminio (D=0.05m) en baño temostático (convección forzada) la temperatura de la esfera antes de sumergirla en el baño era de 20 °C y la del fluido 90°C siendo la temperatura de film Tf= 55°C.

Las propiedades físicas del agua a distintas temperaturas se obtuvieron de la Tabla 3-1.

Tabla 3-1: Propiedades termofísicas del agua en el rango de temperaturas entre 0 y 120 °C

T °C	Densidad (Kg/m ³)	Calor específico (J/Kg°C)	Conductiv. Térmica (W/m°C)	Dif.térmica $\alpha \cdot 10^6$ (m ² /seg)	Visc.dinám. $\eta \cdot 10^6$ (N.seg/m ²)	Visc.cinem. $\nu \cdot 10^6$ (m ² /seg)	Nº de Pr	$\frac{g\beta}{\nu^2} \cdot 10^{-9}$
0	999.9	4226	0.558	0.131	1794	1.789	13.7	
20	998.2	4182	0.597	0.143	1004	1.006	7.02	2.035
40	992.3	4178	0.633	0.151	653.0	0.658	4.34	8.833
60	983.2	4181	0.658	0.155	470.0	0.478	3.02	22.75
80	971.8	4194	0.673	0.165	353.7	0.364	2.22	46.68
100	958.4	4211	0.682	0.169	281.0	0.294	1.75	85.09
120	943.1	4245	0.685	0.171	233.0	0.247	1.45	

El número de Prandtl a temperatura Tf calculado con la Ec. 3-34 fue igual Pr=3.4. Se midió la velocidad del agua en el baño temostático resultando de 35 cm/s (DE=4 cm/s). Se calculó un valor medio del número de Re (Ec.3-32), siendo igual a 3.74x10⁴. Finalmente se calculó el número de Nusselt con la Ec. 3-33; donde h= coeficiente de transferencia de calor (W/m²K); D=diámetro de la esfera (m); k= coeficiente de conductividad térmica del fluido externo (agua) =0.65 W/m K ,

resultando $Nu = 176.92$ y $h = 2300 \text{ W/m}^2\text{K}$.

Aplicando la correlación (3-53) para los repollitos con $D_{\text{medio}} = 0.036 \text{ m}$ y teniendo conocidos los valores de las propiedades termofísicas del agua el resultado obtenido fue $h = 2414 \text{ W/m}^2\text{K}$.

Para el caso del enfriamiento en baño agua/hielo de esferas de aluminio, la aplicación de la Ec. (3-31) a los datos experimentales de temperatura en función del tiempo condujeron a un valor de $h = 494 \text{ W/m}^2\text{K}$ ($DE = 50$) $\text{W/m}^2\text{K}$.

Asimismo se aplicó una correlación para esferas en convección natural:

$$Nu = 2 + 0.6 Gr^{1/4} Pr^{1/3} \quad (3-54)$$

siendo: $Nu = \frac{h D}{k} = \text{Nusselt}$; $Gr = \frac{D^3 \rho^2 g \beta \Delta T}{\mu^2} = \text{Grashof}$; $Pr = \frac{C_p \mu}{k} = \text{Prandtl}$

Para la etapa de enfriamiento de esferas de aluminio los valores calculados fueron $Grashof = 2.8 \times 10^6$; $Pr = 3.55$ resultando un valor de $Nu = 39$ y $h = 500 \text{ W/m}^2\text{K}$, similar al valor del coeficiente obtenido experimentalmente. Para el caso de repollitos la aplicación de la correlación en convección natural ($D = 0.036 \text{ m}$) condujo a $h = 567 \text{ W/m}^2\text{K}$ para el baño agua/hielo.

3.8.3. Validación del proceso de pre-calentamiento del vegetal

Partiendo de las propiedades termofísicas del Repollito de Bruselas y los coeficientes de transferencia calórica determinados se simuló el proceso de calentamiento usando el software COMSOL Multiphysics 3.5a. Se tuvo en cuenta la malla generada y el sub-dominio planteado el cual corresponde a la zona apical del vegetal. Para validar el modelo numérico se compararon las historias térmicas obtenidas experimentalmente en el tratamiento térmico con las temperaturas resultantes de las predicciones numéricas. Las temperaturas obtenidas experimentalmente correspondieron a: (i) medio exterior (baño termostático y agua/hielo), (ii) interior del repollito (termocupla ubicada en zona apical del vegetal; $z = 2 \text{ cm}, r = 0$).

La Fig.3-13 muestra los resultados obtenidos para los tratamientos, en esta se puede observar la concordancia entre las temperaturas predichas y obtenidas experimentalmente. Para los tres replicados realizados el desvío estándar promedio (root mean square error= RMSE) calculado fue de 1.85, 2.55 y 2.33 °C.

Como se observa en la historia térmica correspondiente a la etapa de enfriamiento,

(Fig. 3-13a) la zona apical (centro) presenta un retardo en su respuesta manteniendo temperaturas altas a pesar que la zona externa se encuentra sometida a enfriamiento. Por lo tanto en los primeros minutos de enfriamiento las altas temperaturas en el centro siguen inactivando las enzimas afectando compuestos termolábiles.

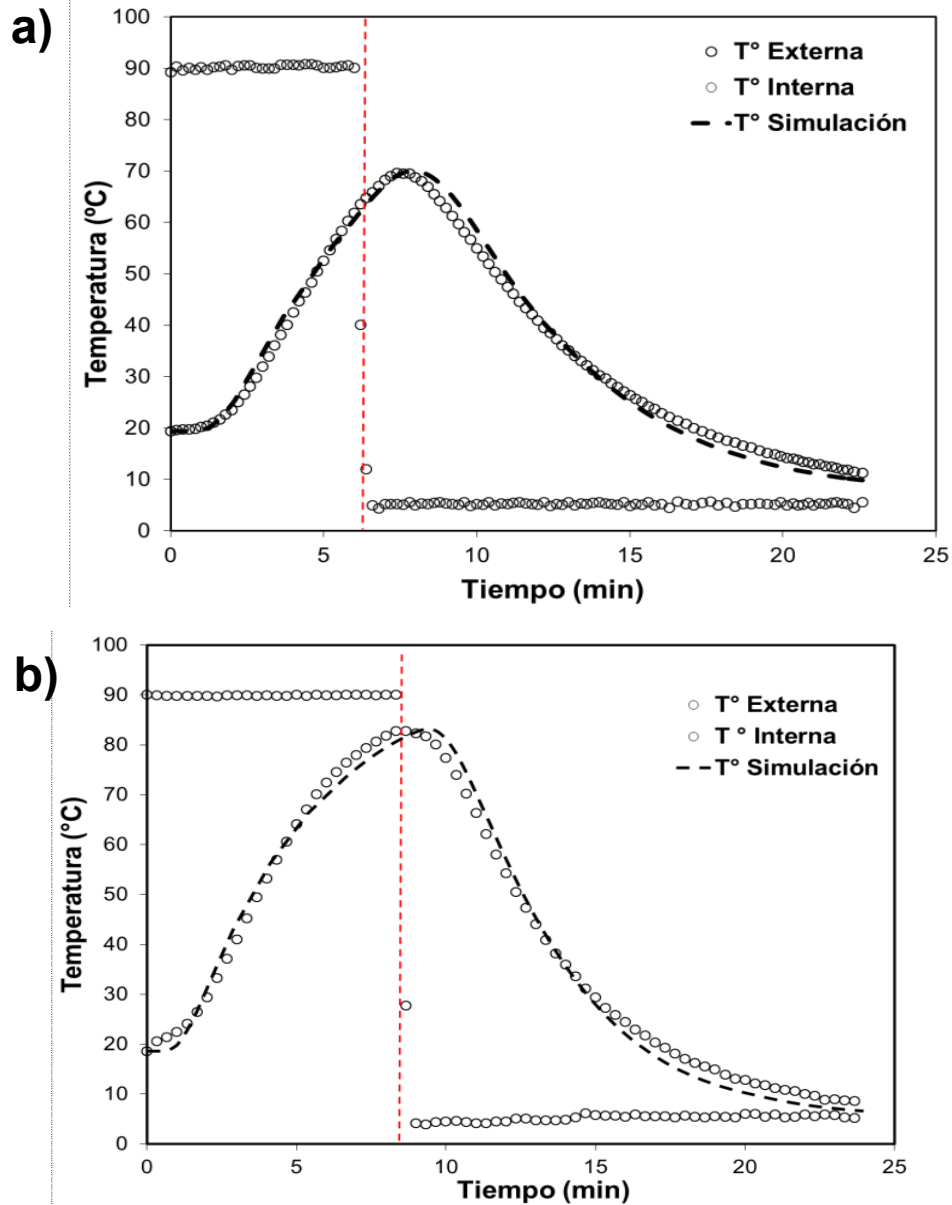


Fig. 3-13. Comparación entre las temperaturas experimentales y predichas durante las etapas de pre-tratamiento térmico. Temperatura del agua 90°C. h baño termostático=2414 W/m²K ; h baño agua/hielo=567 W/m²K. a) Tiempo calentamiento: 6 min; Posición de la termocupla $r=0$, $z= 21.3$ mm; b) Tiempo calentamiento: 8.3 min; Posición de la termocupla $r=0$, $z= 14.94$ mm

En la Fig. 3-14 se observa la distribución de temperaturas durante el calentamiento y enfriamiento; el caso mostrado corresponde a 6 min de pre-tratamiento térmico con posterior enfriamiento en baño agua/hielo. El conocimiento del perfil de temperaturas permite estimar los tiempos adecuados de procesamiento para evitar la sobrecocción del vegetal lo cual conduce a la pérdida de compuestos bio-activos termolábiles como el ácido ascórbico. Simular el procesamiento térmico permite establecer los tiempos adecuados para la lograr inactivación enzimática, que puede ser aplicada en cualquier otra situación de temperatura del medio calefactor y tiempo de procesamiento o temperatura inicial del vegetal. Asimismo el modelo puede aplicarse a vegetales con distintas dimensiones generando previamente el dominio y su discretización.

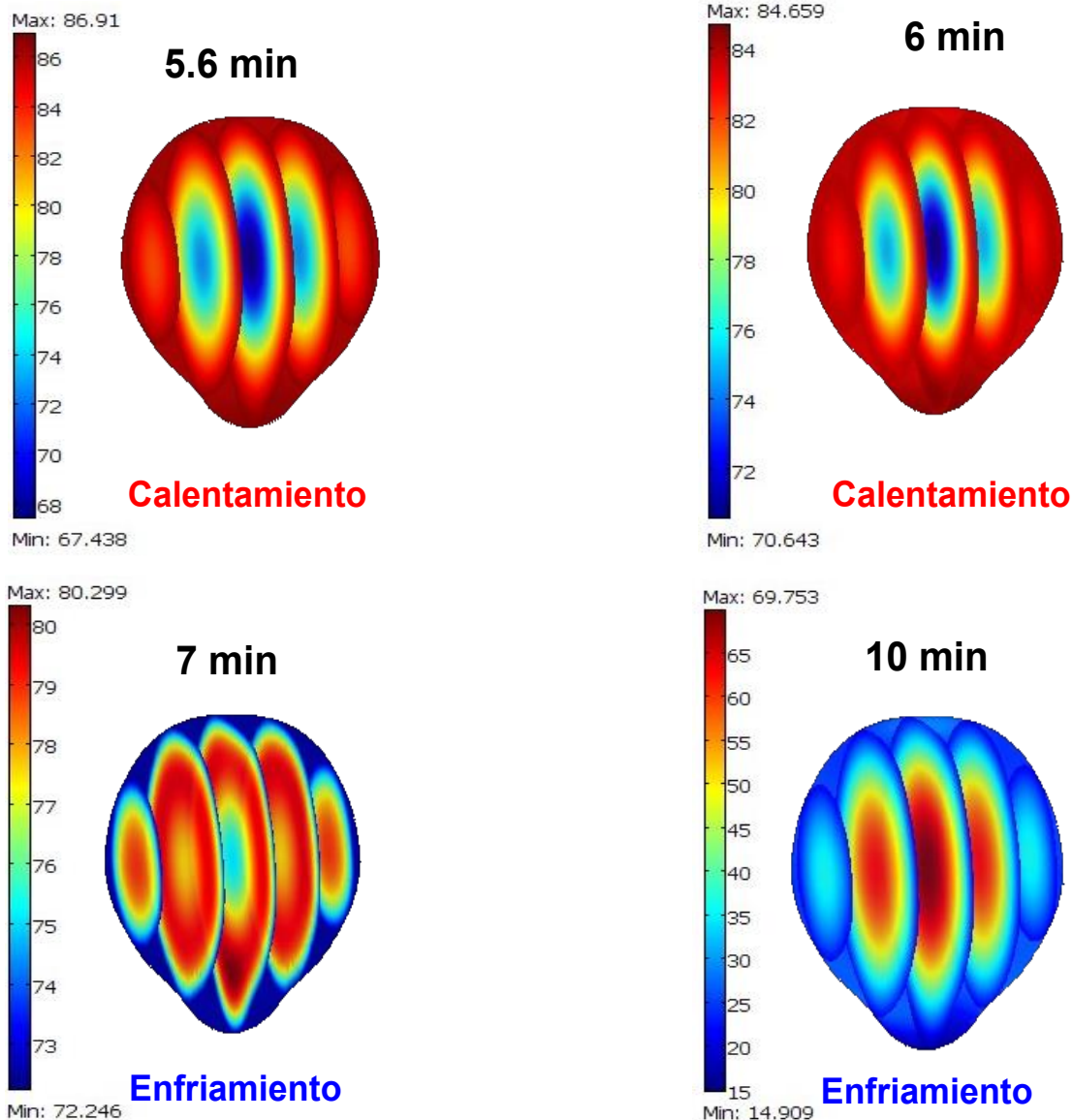


Fig. 3-14. Distribución de temperaturas en el repollito de Bruselas en diferentes etapas de proceso térmico (calentamiento y enfriamiento); tiempo de calentamiento 6 min

3.8.4. Modelado de la Inactivación Enzimática

Los parámetros cinéticos usados para acoplar la inactivación enzimática de POD y LOX en repollitos de Bruselas (*Brassica oleracea* L. *gemmifera*) a la simulación fueron los determinados experimentalmente (Capítulo 2). Estos corresponden a Energías de activación y constantes cinéticas a 80°C de cada una de las fracciones térmicamente diferentes.

La Tabla 3-2 presenta esta información además de la fracción de isoenzima resistente (α_R). Se tuvo en cuenta que la actividad enzimática inicial del vegetal antes del procesamiento térmico fue 457.08 (DE=64.87) y 44.89 (DE=4.24) Uo/g_{peso seco} para POD y LOX respectivamente.

Tabla 3-2. Parámetros cinéticos utilizados en la simulación numérica de inactivación enzimática, en paréntesis se presenta la desviación estandar

	LOX	POD
E_{aL} (KJ/mol)	65.8 (4.5)	62.5(1.9)
E_{aR} (KJ/mol)	63.7 (2.8)	56.3(3.0)
$k_{Ref-L} \times 10^2$ (s ⁻¹)	4.24 (0.42)	2.05 (0.02)
$k_{Ref-R} \times 10^4$ (s ⁻¹)	1.61 (0.16)	0.537 (0.015)
$\alpha_R\%$	30.97(1.03)	25.02 (1.04)

El acoplamiento de la cinética de inactivación enzimática se realizó generando la temperatura media del subdominio en COMSOL, luego se exportó esta información a un archivo ASCII para ser utilizada en el programa MATLAB que calcula la concentración residual de enzima a la que se le introduce la historia térmica del modelo numérico. En el anexo I se presenta el programa usado para acoplar la cinética de inactivación enzimática.

En la Fig. 3-15 se muestran las predicciones numéricas de inactivación enzimática de POD y LOX, conjuntamente con la simulación de la transferencia de energía. El gráfico muestra la concentración media de las enzimas en el sub-dominio estudiado

(zona apical), en función del tiempo de calentamiento. A partir del acoplamiento del modelo de transferencia de energía no estacionario a la cinética de inactivación enzimática y teniendo en cuenta que en el enfriamiento la zona apical del vegetal mantiene temperaturas altas debido a la inercia térmica del proceso de enfriamiento (Fig.3-15), continúa la inactivación enzimática disminuyendo el %AE para las enzimas estudiadas.

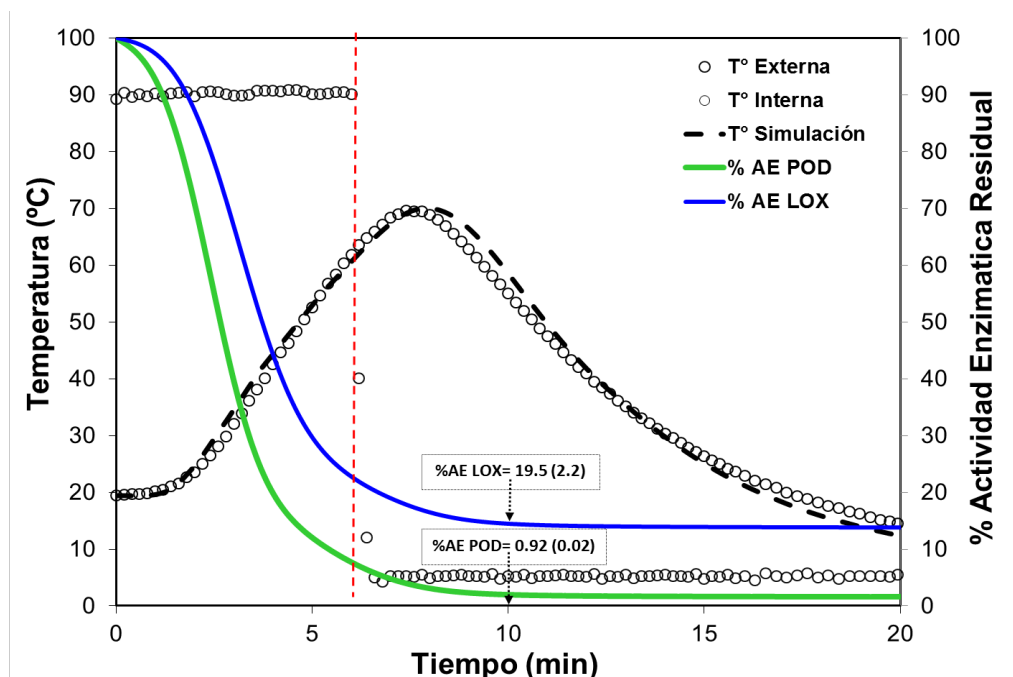


Fig. 3-15. Resultados del acoplamiento de la simulación numérica y las cinéticas de inactivación enzimática las etapas de pre-tratamiento térmico. En recuadro de presenta los porcentajes de actividad enzimática residual (%AE) obtenidos experimentalmente para la zona apical, n=6

Según la simulación al finalizar los tratamientos térmicos de pre-cocción (6 min) en baño termostático a 90°C y enfriamiento en baño agua/hielo para la POD el %AE calculado fue de 1.59 % y para la LOX de 13.78 %.

Estos resultados se validaron experimentalmente sometiendo repollitos de Bruselas a las mismas condiciones térmicas de la simulación; de los vegetales se obtuvieron extractos enzimáticos de la zona apical obteniendo un %AE promedio para un n=6 de 0.92 % (0.05) para la POD y 19.5 % (2.2) para la LOX. A partir de estos resultados se validó el adecuado acoplamiento de la simulación del procesamiento térmico al modelo de inactivación enzimática.

En la Fig. 3-16 a y b se muestran las predicciones numéricas del modelo desarrollado para la inactivación enzimática integrado en todo el dominio del vegetal en función del tiempo de calentamiento a 90°C distinguiendo cada una de las

fracciones térmicamente diferentes. Partiendo de estos se pudo predecir el %AE a diferentes tiempos de proceso del pre-tratamiento térmico. Estas simulaciones son importantes para definir la actividad enzimática residual inicial con la cual el producto ingresa al proceso de congelación.

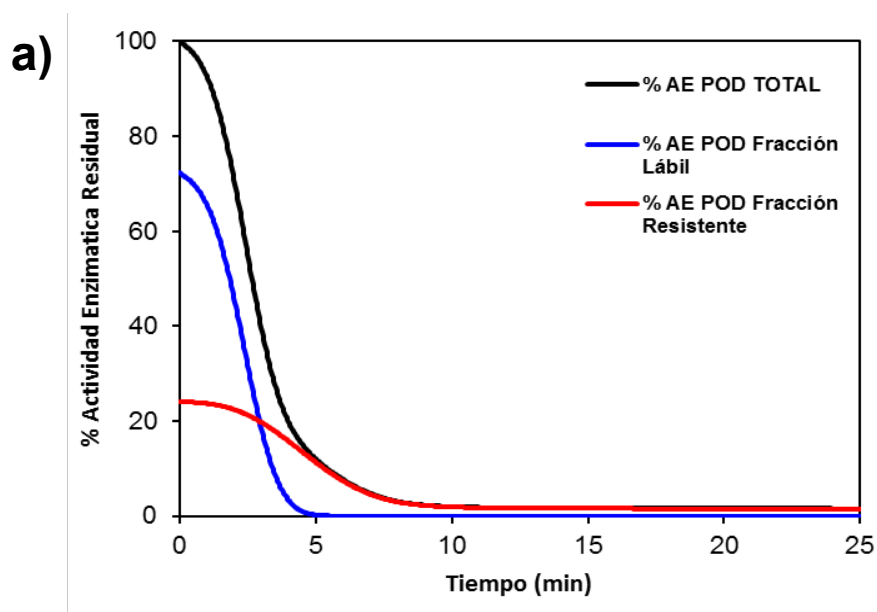


Fig. 3-16 (a) % Actividad enzimática Residual después del pre-tratamiento térmico de la enzima total (curva negra), fracción lábil (curva azul) y resistente (curva roja) expresada como AE/g producto seco para la Peroxidasa (POD)

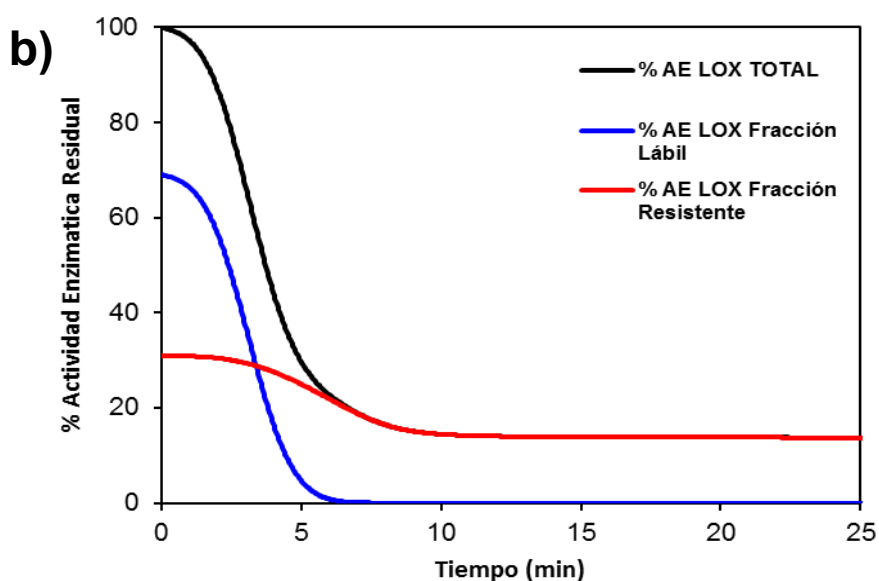


Fig. 3-176 (b) % Actividad enzimática Residual después del pre-tratamiento térmico de la enzima total (curva negra), fracción lábil (curva azul) y resistente (curva roja) expresada como AE/g producto seco para la Lipoxigenasa (LOX)

3.8.5. Parámetros de calidad después del pre-tratamiento térmico en repollitos de Bruselas

Se caracterizaron muestras de repollitos de Bruselas después de ser sometidas al pre-tratamiento térmico. En la Tabla 3-3 se muestra los resultados obtenidos de la cuantificación del porcentaje de Actividad Enzimática Residual (%AE), porcentaje de ácido ascórbico residual (%AA) y la variación de color. Se realizó el correspondiente test de comparación de medias, este se aplicó independiente para cada zona. La Tabla 3-3 se presenta la variación en la textura de los repollitos después del pre-tratamiento térmico. Cada uno de las determinaciones se realizó a los tres tiempos de proceso (3, 6 y 10 min) y los resultados se compararon con el vegetal sin tratamiento térmico.

3.8.5.1. Variación en el porcentaje de actividad enzimática (%AE)

La Tabla 3-3 presenta los %AE para LOX y POD para dos zonas diferentes del vegetal. Estos valores se pueden comparar con los obtenidos en las predicciones utilizando la simulación desarrollada (Fig.3-16), lográndose una buena concordancia.

Tabla 3-3 Parámetros en zona apical y externa del vegetal a diferentes tiempos de Pre-tratamiento térmico. Actividad enzimática (%) de LOX y POD, n = 6. Ácido Ascórbico residual (%), n=2. Parámetros de color (L *, a *, b *, ΔE y h°), n=10. Los valores entre paréntesis corresponden a desviaciones estándar. Diferentes letras en la misma columna de las dos zonas indican diferencias significativas entre las muestras (P<0.05)

ZONA	t (min)	%AE		% AA	PARAMETROS COLOR				
		LOX	POD		L*	a*	b*	h°	ΔE
APICAL	3	24.01 a (1.1)	7.3 a (0.9)	98 a (1)	48.1 a (5.5)	-12 a (1)	23.5 a (0.7)	118.4 a (2.4)	22.8 a (5.5)
	6	19.5 c (2.2)	0.92 c (0.05)	93 a (4)	44.0 a (0.3)	-10.6 b (3.3)	17.9 c (1.2)	119.9 a (7.1)	33.1 b (0.3)
	10	17.2 c (1.5)	0.12 c (0.03)	52 b (4)	44.1 a (4.0)	-10.1 b (1.2)	17.3 c (1.7)	120.2 a (2.9)	32.9 b (4.0)
EXTERIOR	3	23.9 a,b (2.7)	2.7 a (0.3)	87 a,b (3)	45.7 a (2.9)	-12.1 a (1.4)	21.5 a (1.1)	119.3 a (2.2)	12.1 a (2.3)
	6	21.9 a (2.0)	0.78 a,b (0.07)	78 b (1)	43.2 b (1.6)	-15.1 c (1.6)	22.8 a,b (5.6)	126.5 c (2.8)	14.9 b (1.2)
	10	20.3 a (0.9)	0.11 b (0.01)	39 c (3)	41.8 b (1.1)	-17.6 c (0.7)	18.2 c (0.9)	134.2 e (1.7)	16.5 b (1.2)

Por ejemplo a los 10 minutos según las predicciones el vegetal alcanza un % de inactivación de 1.9 para la POD y 14.5 para la LOX, comparando estos a nivel

experimental se reportaron valores similares de %AE. Esto indica que la simulación desarrollada pudo predecir la actividad de enzima residual después del procesamiento térmico y de esta forma optimizar el procesamiento térmico.

Williams y col. (1986) sugirieron que para obtener mejores productos de calidad se recomienda un % AE de POD en el rango de 7.5 a 11 % para repollitos de Bruselas. Según los resultados de la Tabla 3-3, para todos los tiempos ensayados se alcanzó un valor inferior a lo recomendado en literatura. En el caso de LOX hay poca información en relación con los valores de la actividad residual óptima en las vegetales de la familia de las crucíferas.

Con respecto %AE de la POD, se puede ver en la Tabla 3-3 que en la zona apical el tratamiento de 3 minutos fue significativamente distinto que los de 6 y 10 minutos al aplicar el test Fisher ($P < 0.05$).

En la zona exterior los valores de %AE de la POD resultaron menores a los de la zona apical y las diferencias entre los tiempos de tratamiento no fueron tan marcadas como en el centro. Esto se puede atribuir a la diferencias en la penetración térmica de ambas zonas.

3.8.5.2. Variación en el porcentaje de ácido ascórbico residual (%AA)

En la Tabla 3-3 se presentan los resultados de la variación del ácido ascórbico (AA) o vitamina C. El AA es un compuesto orgánico hidrosoluble con actividad antioxidante, participa en muchas funciones bioquímicas como la absorción de hierro, la síntesis de colágeno y hormonas (cofactor enzimático), y neutralizar radicales libres regenerando el metabolismo celular (antioxidante), previene el envejecimiento, la formación de cataratas, aterosclerosis, cáncer y enfermedades cardiovasculares. La recomendación diaria de consumo es de 75 y 90 mg/día para mujeres y hombres adultos respectivamente (Hernandez y col., 2006). Se caracteriza por ser termolábil, por lo tanto en frutas y vegetales la variación en la concentración de AA se utiliza como parámetro de calidad para otros componentes sensoriales o nutritivos. El contenido de AA en vegetales es muy variable tanto por causas genotípicas como de manejo pre y postcosecha. En los tratamientos de conservación postcosecha, la pérdida de vitamina depende fundamentalmente del tiempo y la temperatura de almacenamiento, de la exposición a la luz y del grado de daño tisular (Giannakourou y Taoukis, 2003).

La vitamina C se refiere principalmente a todos los compuestos que exhiben

actividad biológica equivalente al ácido L-ascórbico (L-AA) incluyendo los productos oxidados por acción del ascórbico oxidasa produciendo el ácido dehidroascórbico (ADHA), isómeros como el ácido isoascórbico (IAA) y ésteres como el palmitato de ascorbilo, el ADHA es susceptible a la oxidación generando el ácido 2,5-dicetogulónico (ADKG) que carece de actividad vitamínica (Spínola y col., 2014).

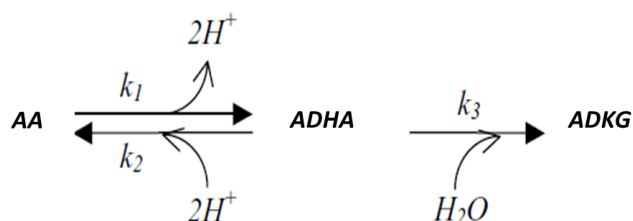


Fig. 3-18 Mecanismo de degradación del ácido ascórbico (AA) a ácido dehidroascórbico (ADHA) y Ácido 2,5-dicetogulónico (ADKG)

El contenido de AA se cuantificó por cromatografía líquida de alta performance (HPLC). A partir de la relación lineal obtenida entre el área bajo la curva de los picos del estándar en los cromatogramas y las distintas concentraciones de ácido ascórbico, se obtuvo la ecuación utilizada para calcular la concentración de AA en las muestras de vegetales. La curva de calibración para las muestras de repollitos de Bruselas después del pre-tratamiento térmico se muestra en la Fig.3-19.

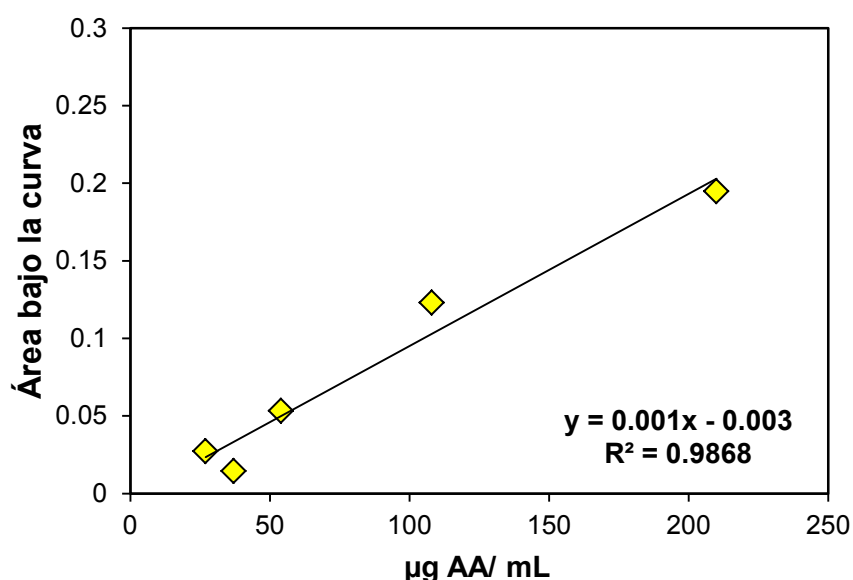


Fig. 3-19 Curva de calibración de ácido ascórbico obtenidas por HPLC después del pre-tratamiento térmico. Los símbolos corresponden a los datos experimentales y la línea a la regresión lineal

Con la curva de calibración obtenida para los distintos tiempos de tratamiento se cuantificó la variación del AA. Los resultados se presentan en la Tabla 3-2 en la que

se puede observar cómo disminuye la cantidad de AA después del procesamiento. Para los repollitos de Bruselas frescos sin tratamiento térmico el contenido de AA (Desviación estándar en paréntesis) fue de 69.4 (DE=8.9) y 84.4 (DE=4.9) mg/100_g tejido fresco para la zona apical y la zona exterior respectivamente. Luego de los diferentes pre-tratamientos térmicos en la zona apical para 3 y 6 min no existió una reducción significativa del contenido de AA, en cambio en la zona exterior se presentó mayor reducción de AA.

Resultados similares para todo el vegetal sin diferenciar dos zonas fueron reportados por Viña y col., (2007). Estos autores indicaron que para escaldado de repollitos de Bruselas sometidas a 3 min de calentamiento en agua a 100°C el %AA no presentó diferencias significativas con respecto a un vegetal sin tratamiento, en cambio un procesamiento comprendido en dos etapas de calentamiento, una primera de 5 min a 50°C y finalizando 3 min a 100°C alcanza una reducción significativa del contenido de AA, por lo cual es importante un tratamiento a alta temperatura y corto tiempo (HTST, por su sigla en inglés) para evitar la pérdida de este compuesto. Murcia y col., (2000) reportaron una variación drástica en el contenido de AA para brócoli debido al tiempo de exposición en el tratamiento de pre-cocción, si se somete el vegetal a una temperatura de 90°C durante más de 15 minutos; en ese caso existe una pérdida comprendida entre 40 y 50 % de este compuesto.

González-Hidalgo y col., (2018) determinaron la variación de AA y ADHA en inflorescencias de brócoli después de escaldado durante 2 min a 97°C, estos investigadores indicaron que en estas condiciones de ensayo se logra una pérdida del 82.6 % en la suma de estos dos compuestos. Al ser el AA un compuesto hidrosoluble, en los procesos de inactivación enzimática por inmersión en agua los tejidos vegetales sufren cambios especialmente de permeabilidad, por lo tanto en estas condiciones de calentamiento la lixiviación de compuestos como el AA se presenta afectando su contenido (Olivera y col., 2008). Asegurar que este tipo de compuesto no se degrade en el pre-tratamiento térmico es importante para preservar las características nutricionales del vegetal. Además del AA existen otros tipos de compuestos termolábiles como polifenoles, los cuales se ven afectados en el procesamiento térmico (Viña y col., 2007, González-Hidalgo y col., 2018).

3.8.5.3. Variación del color

La apariencia muchas veces es único atributo en el cual los consumidores basan la decisión de compra o consumo de un producto. Los atributos de la sensación visual son el color, la luminosidad y la saturación, los cuales se correlacionan con la longitud de onda, la luminancia y la pureza colorimétrica respectivamente. En la Tabla 3-2 se presenta los resultados de los diferentes parámetros colorimétricos analizados. En la zona apical no se notaron diferencias significativas del parámetro L^* , en cambio en las zona exterior existió una disminución de este parámetro presentándose diferencias entre los vegetales expuesto a 10 min y los demás tiempos de tratamiento, eso quiere decir a los 10 min el vegetal tiende a verse más opaco.

Para el caso de la zona exterior existió un incremento del h° a medida que aumentaba el tiempo de calentamiento. Esto indica que los repollitos fueron más verdes, ya que para este color el parámetro del h° es 120. La intensificación del color verde se corrobora con la disminución del parámetro L^* y los valores negativos del parámetro a^* . Mazzeo y col. (2015) estudiaron los efectos en el cambio de color de vegetales “verdes” después de procesamiento térmico; estos investigadores encontraron que para el caso de tallos de espárragos se observaba una disminución de L^* , aumento de h° y no aparición de colores amarillos (bajo b^*) en comparación con muestras frescas del vegetal; estos mismos resultados fueron observados por Begum y Brewer (1997).

En Brócoli la disminución de L^* en las inflorescencias es una tendencia que resulta de la pre-cocción (González-Hidalgo y col., 2018; Barret, 2008). Es importante destacar que durante los procesos de cocción de vegetales verdes este color se ve afectado debido a que va disminuyendo en intensidad cuando los tratamientos son excesivos (Viña y col., 2007; Barret, 2008; Bahçeci y col., 2005), sin embargo en las primeras etapas de pre-cocción se ve una intensificación del verde, este fenómeno se ha explicado como causa del aire que es removido alrededor de los folículos superficiales de los tejidos de las plantas además de la expulsión del aire entre las células; este hecho causa alteraciones de las propiedades de reflexión de luz en la superficie (Tijskens, Schijvens, y Biekman, 2001; Lau, Tang, y Swanson, 2000; Olivera y col., 2008; Viña y col., 2007; Mazzeo y col., 2011; Paciulli y col., 2014). Por otra parte cuando el calentamiento es intenso existe una pérdida significativa del color verde, esto se debe a la degradación de la clorofila causando la aparición de

tonos pardos o verdes olivas, esto se debe generalmente al cambio que sufre la clorofila a feofitina, y a la consecuente degradación a feoforbidos y clorinas (Castelfranco y Beale, 1981; Bahçeci y col., 2005).

Además de los parámetros de color mencionados se determinó el ΔE usando la Ec. 3-52. Esta diferencia se calculó teniendo en cuenta los cambios en los parámetros de color (L^* , a^* y b^*) de los repollitos de Bruselas al finalizar cada pre-tratamiento térmico con respecto al vegetal fresco. En la zona exterior el proceso de calentamiento genera una apariencia más verde en los vegetales con respecto al fresco, esto se demuestra que para el tratamiento de 10 min el ΔE obtenido es mayor en comparación a los otros tiempos de calentamiento.

Turkmen, Poyrazoglu, Sari, y Velioglu (2006) indicaron que para el caso de arvejas el parámetro ΔE no se ve afectado cuando se aplican tiempos de calentamiento adecuados, los cuales ayudan a preservar el vegetal evitando el deterioro; estos resultados también fueron reportados por Mazzeo y col., (2015) para el caso de espárragos verdes, arvejas.

En el caso de brócoli el ΔE genera diferencias debido a la morfología del vegetal que lo hace susceptible a los cambios de temperatura, por lo tanto después de un tratamiento térmico es evidente que en comparación con un vegetal fresco el ΔE va a ser alto (Tijsskens, Schijvens y Biekman, 2001) debido a los cambios efectuados de las clorofilas a feofitinas.

3.8.5.4. Variación de parámetros de textura

La pre-cocción de vegetales genera cambios estructurales importantes debido a la lixiviación de agua presente en las paredes celulares, este fenómeno afecta la apreciación sensorial del producto por lo tanto es importante no sobrepasarse en este proceso (Kidmose y Martens, 1999).

En la Tabla 3-4 se presenta la variación del porcentaje de fuerza máxima (%Fm) y la variación porcentual del coeficiente de elasticidad (%Ce) con respecto al vegetal fresco. Para los parámetros evaluados se evidencia que la fuerza máxima disminuye con respecto al tiempo de tratamiento térmico mostrando en los tres casos que existen diferencias significativas; esto indica que el vegetal es más blando. Viña y col. (2007) reportaron que para repollitos de Bruselas sumergidos en agua a 100°C durante 1,3 y 4 minutos decrece la fuerza máxima entre un 80 y 86%.

Tabla 3-4 Variación de los parámetros de textura, Los valores entre paréntesis corresponden a desviaciones estándar. Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas entre las muestras ($P \leq 0.05$)

t (min)	%Fm	%Ce
3	92 a (16)	93 a (26)
6	50.1 b (7.6)	23.8 b (4.2)
10	33.9 c (8.0)	17.2 c (4.5)

Para el %Ce sucede lo mismo que para %Fm, por ende valores menores en el coeficiente de elasticidad indican que se necesita menos fuerza para provocar la deformación siendo así su estructura menos rígida (Vargas y col., 2000). El coeficiente de elasticidad se relaciona con propiedades elásticas siendo considerado como un índice de la rigidez de la muestra (Nguyen y col., 2010).

Paciulli y col., (2014), demostraron los cambios que se presentan en los tejidos vegetales después de la pre-cocción realizando micrografías de cortes histológicos de espárragos; en estos se observó la separación de membrana plasmática de la pared celular y ruptura del colénquima a medida que aumenta el tiempo de tiempo de tratamiento térmico, estos resultados condujeron a la disminución en la fuerza máxima de deformación siendo un fenómeno irreversible. Greve y col., (1994) mencionan que la variación en la textura en vegetales se atribuye a una combinación de dos factores: (i) una pérdida en la firmeza debido al daño de la membrana generando y (ii) despolimerización y solubilización de la pectina presente en las membranas celulares del vegetal afectando la adhesión célula-célula.

3.9. CONCLUSIONES PARCIALES

- El modelo numérico implementado permitió simular el proceso de pre-tratamiento térmico con el fin de representar el proceso global. La simulación llevada a cabo se validó experimentalmente usando las propiedades termofísicas del vegetal y los coeficientes de transferencia calórica en interfase de los medios usados en el

procesamiento.

- Al modelo matemático se acoplaron las cinéticas de inactivación enzimática y las energías de activación para la POD y LOX determinadas experimentalmente y calculadas mediante regresiones no-lineales.
- A partir de la simulación se logró calcular la concentración media de las enzimas en el producto, las cuales son indicadoras del pre-tratamiento, considerando su cinética bifásica donde existen isoenzimas termo-lábiles y resistentes por lo tanto el modelo es capaz de determinar los tiempos adecuados de pre-tratamiento térmico.
- Por medio de experimentos donde se varió el tiempo de pre-tratamiento térmico se logró cuantificar la actividad enzimática residual para las dos enzimas estudiadas; esto se comparó con el modelo desarrollado obteniendo buena concordancia.
- Se lograron cuantificar varios parámetros de calidad sensorial (variación de color y textura) y nutricional (contenido de ácido ascórbico) después del pre-tratamiento térmico, estableciendo los tiempos de precocción para los cuales los vegetales presentan cambios con respecto a un vegetal sin procesamiento.



CAPITULO 4

SIMULACIÓN DEL PROCESO DE CONGELACIÓN DE REPOLLITOS DE BRUSELAS



4. SIMULACIÓN DEL PROCESO DE CONGELACIÓN DE REPOLLITOS DE BRUSELAS

En el presente capítulo se describe la simulación computacional del proceso de congelación de los repollitos de Bruselas para obtener un producto pre-cocido congelado. Para ello se utiliza un código computacional propio desarrollado previamente en el grupo de investigación para simular el problema matemático no lineal de transferencia de energía en estado no estacionario de congelación teniendo en cuenta la variación de las propiedades termofísicas con la temperatura.

4.2. OBJETIVOS DEL CAPITULO

- I. Desarrollar e implementar un programa para simular el problema no lineal de congelación de los repollitos de Bruselas, teniendo en cuenta su geometría irregular.
- II. Utilizar dicho programa que considera la abrupta variación de las propiedades termofísicas con la temperatura utilizando el método de los elementos finitos y la formulación entálpica y de Kirchhoff.
- III. Determinar el calor específico aparente utilizando Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) y los coeficientes de transferencia calórica en la interfase en el sistema de congelación estudiado.
- IV. Validar las predicciones numéricas mediante resultados experimentales de historias térmicas en equipos de congelación a escala piloto.

4.3. GENERALIDADES DE LOS VEGETALES PRE-COCIDOS CONGELADOS

La industria de los alimentos congelados nació en 1930; Clarence Birdseye, es considerado el padre de la industria moderna de alimentos congelados ya que inventó el congelador de doble cinta; desde entonces estos productos se han mantenido comercialmente generando tendencia de crecimiento debido a los nuevos perfiles de consumo, que incluyen la incorporación de los vegetales a la dieta debido a los componentes benéficos para la salud humana (Frozen Food Fundation, 2016). La congelación de vegetales viene acompañada de un pre-tratamiento térmico corto que mejora el color y la textura de los vegetales, el estudio de la optimización de

procesamiento de esta primera etapa ya se evaluó en el capítulo anterior. La combinación de estos dos tratamientos aumenta la vida útil del vegetal durante el almacenamiento congelado generalmente a -18°C . La sumatoria de todas estas operaciones produce cambios irreversibles en los vegetales por lo tanto es importante controlar y optimizar cada una de ellas. Los vegetales pre-cocidos congelados que se comercializan en el mercado son sometidos a un calentamiento-descongelación por parte del consumidor.

En la ingeniería de alimentos estudiar el proceso de congelación es importante ya que un adecuado análisis de este fenómeno permite realizar un correcto diseño y optimización de las plantas industriales (Rabellato y col., 1978). Por consiguiente es necesario contar con predicciones precisas de los tiempos de congelación, velocidades de congelación y distribución de temperaturas en el alimento.

Para llevar a cabo el análisis de transferencia de energía en la congelación se debe tener en cuenta que las propiedades termofísicas varían fuertemente con la temperatura debido a la transformación del agua en hielo. Las soluciones de este tipo de problemas con cambio de fase son complejas dado que representan desde el punto de vista matemático un problema altamente no lineal; las propiedades termofísicas como la conductividad térmica, densidad y calor específico que aparecen en la ecuación diferencial de conducción de calor dependen de la variable dependiente la temperatura.

Encontrar una solución convergente a este tipo de problemas no lineales suele ser un desafío en el campo de la simulación numérica (Pham y col., 2012).

El uso de softwares comerciales como el COMSOL implementan el Método de Elementos Finitos (MEF), sin embargo, presenta problemas de convergencia cuando se simulan problemas con cambio de fase donde las propiedades son variables con la temperatura, en especial el calor específico aparente que tiene una funcionalidad cuasi Delta de Dirac. Esto se debe a que utilizan el concepto calor específico aparente (CP_{ap}) cuya abrupta variación con la temperatura en el rango de cambio de fase provoca la divergencia de la solución numérica (Santos, 2010).

Una alternativa es usar las formulaciones entálpicas; donde se aplica la integral del calor específico con la temperatura (Comini, 1989; Pham, 2000). Esta variable entalpía es una función matemática más suave, continua y con derivadas continuas en todo el rango de temperatura estudiado. Asimismo, la reformulación propuesta incluye otro cambio de variable, en este caso el de la conductividad térmica a través

de la función de Kirchhoff ($E = \int k(T)dT$) donde la integral E representa una función matemática con cambios más suave comparado con la conductividad térmica versus T.

La transformación de variables: calor específico aparente en entalpía y conductividad térmica en función de Kirchhoff (Fikiin 1996,1998; Scheerlinck y col., 2001) permite la convergencia de la solución numérica cuando se simula problemas con cambio de fase como es el caso de la congelación.

4.4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.4.1. Modelado matemático

El repollito de Bruselas se representa mediante un sólido de revolución donde en $x=0$ presenta un eje de simetría, utilizando coordenadas cilíndricas la ecuación diferencial de conducción de calor con cambio de fase es:

$$\rho(T)C_p(T) \frac{\partial T}{\partial t} r = \frac{\partial}{\partial r} \left(k(T) r \frac{\partial T}{\partial r} \right) + \frac{\partial}{\partial z} \left(k(T) r \frac{\partial T}{\partial z} \right) \quad \text{en } \Omega \quad (4-1)$$

Se consideró que el vegetal se encuentra inicialmente a una temperatura uniforme y es enfriado en un equipo de congelación operando a una temperatura constante, con un coeficiente de transferencia calórico en la interfase (h). Las condiciones iniciales y de contorno son las siguientes:

$$\left(\frac{\partial T}{\partial z} \cdot n_z + \frac{\partial T}{\partial r} \cdot n_r \right) k = h(T_{\text{ext}} - T) \quad t \geq 0 \quad \text{en } \partial\Omega_1 \quad (4-2)$$

$$\left(\frac{\partial T}{\partial z} \cdot n_z + \frac{\partial T}{\partial r} \cdot n_r \right) k = 0 \quad t \geq 0 \quad \text{en } \partial\Omega_2 \quad (4-3)$$

$$T = T_0 \quad t = 0 \quad \text{en } \Omega \quad (4-4)$$

donde T_0 es la temperatura inicial ($^{\circ}\text{C}$), T_{ext} es la temperatura externa del medio refrigerante ($^{\circ}\text{C}$), n es el vector normal unitario, h el coeficiente de transferencia calórica ($\text{W/m}^2 \text{ } ^{\circ}\text{C}$), $\delta\Omega_1$ es la interfase del alimento expuesta a una condición de borde convectiva y $\delta\Omega_2$ es el eje donde flujo de calor es cero o eje de simetría .

Se utilizó una transformación de variables expresando la Ec. 4-1 en términos de entalpía (H) y la función de Kirchhoff (E) que es la integral de la conductividad térmica. Las ecuaciones que describen las transformaciones son:

$$H(T) = \int_{T^*}^T \rho(T) \cdot C_p(T) dT \quad (4-5)$$

$$E(T) = \int_{T^*}^T k(T) dT \quad (4-6)$$

A partir de las Ec. 4-6 se construyen 6 relaciones entre las variables: $H(T)$, $E(T)$, $T(H)$, $T(E)$, $H(E)$, y $E(H)$. Todas estas son monótonamente crecientes, continuas y biyectivas porque $\rho(T)$, $C_p(T)$, y $k(T)$ son positivas y acotadas (Fikiin, 1996). La Ec. 4-1 transformada en variable entalpía y función de Kirchhoff resulta en:

$$\frac{dH}{dt} = \nabla^2 E \quad (4-7)$$

Con condiciones de iniciales y de contorno:

$$H = H_0 \quad \text{en } \Omega \quad \text{a } t=0 \quad (4-8)$$

$$-(\nabla E \cdot \mathbf{n}) = h(T - T_{\text{ext}}) \quad \text{en } \delta\Omega_1 \quad \text{a } t>0 \quad (4-9)$$

$$-\nabla E \cdot \mathbf{n} = 0 \quad \text{en } \delta\Omega_2 \quad \text{a } t>0 \quad (4-10)$$

donde $H_0=H(T_0)$. De este modo las no linealidades de las propiedades dependientes de la temperatura en el alimento son eliminadas de las ecuaciones 4-1 a 4-4 e incorporadas como una función que vincula la entalpía volumétrica H con la función de Kirchhoff.

Luego de aplicar la formulación variacional del MEF, el sistema discretizado constituye un sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias, con tantas ecuaciones como nodos tiene la malla:

$$CG \cdot \frac{dH}{dt} + FG \cdot T(H) + KG \cdot E(H) = m \quad (4-11)$$

Donde:

$$CG = \sum_{e=1}^{ne} \int_{\Omega_e} (N^T r N) d\Omega_e \quad \text{es la matriz global de capacitancia}$$

$$KG = \sum_{e=1}^{ne} \int_{\Omega_e} (B^T r B) d\Omega_e \quad \text{es la matriz global de conductancia}$$

$$FG = \sum_{s=1}^{ns} \int_{\Omega_s} (N^T h r N) d\Omega_s \quad \text{es la matriz global conductiva}$$

$m = \sum_{s=1}^{ns} \int_{\delta\Omega_s} (N^T h r T_{ext}) d\delta\Omega_s$ es el vector de fuerzas globales que depende de h y T_{ext} , N es el vector de las funciones de forma, N^t es el vector traspuesto, y H , E , y T son los valores nodales de entalpía, función de Kirchhoff y temperatura, respectivamente. La matriz B (dimensión 2×3) se define como:

$$B = \begin{bmatrix} N_{1r} & N_{2r} & N_{3r} \\ N_{1z} & N_{2z} & N_{3z} \end{bmatrix} \text{ donde } N_{ir} = \frac{\partial N_i}{\partial r}, N_{iz} = \frac{\partial N_i}{\partial z} \text{ para } i=1-3$$

Este sistema se resolvió utilizando una subrutina standard de Matlab 6.5 ODE (del inglés Ordinary Differential Equations) que minimiza los tiempos computacionales del algoritmo numérico. Se puede observar que gracias a la simultánea transformación de variables en entalpía y en la función de Kirchhoff todas las no-linealidades y dependencias de temperatura de las propiedades fueron eliminadas y como consecuencia las matrices en la formulación por elementos permanecen constantes (no aparecen k , C_p y ρ en el cálculo de matrices y vectores elementales); esto significa que las matrices se calculan por fuera del ciclo que avanza en el tiempo reduciendo significativamente el tiempo de máquina (Sheerlinck y col., 2001). En otras palabras, el método permitió transformar un problema altamente no-lineal en uno lineal gracias a la incorporación de las variables E y H . Existen muchos trabajos donde se aplica la variable entalpía en procesos de congelación, sin embargo no es frecuente encontrar la utilización simultánea de la transformación entálpica y de Kirchhoff, siendo este un aporte muy interesante en lo referente a la simulación de problemas no-lineales de congelación.

Reemplazando las funcionalidades de $E(H)$ y $T(H)$ en la ecuación (4-11) resulta el siguiente sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias:

$$\frac{dH}{dt} = f(H, t) \tag{4-12}$$

La Dra. Ing. María Victoria Santos y colaboradores desarrollaron un código computacional propio que permite simular el proceso de congelación (proceso no-lineal con cambio de fase), es decir sin utilizar software comercial. Para este fin se usó el lenguaje Matlab. El programa permite el acoplamiento de subrutinas específicas y utilizar la funcionalidad real de las propiedades termofísicas con la temperatura sin perder convergencia de la solución y optimizando los tiempos de

cálculo computacional.

4.4.2. Propiedades termofísicas

Los repollitos de Bruselas tienen una composición centesimal de 1.74 % carbohidratos, 83.54 (Desviación Estándar=0.55) % de agua, 0.36 (0.02) % de lípidos, 3.20 (0.09) % de proteínas y 1.19 (0.02) % de cenizas, que fue determinada en el capítulo 2.

La dependencia de la conductividad térmica con la temperatura se estimó utilizando un modelo en paralelo (Choi y Okos, 1986).(Fig.6-3)

$$k(T) = \sum x_i^V \cdot k_i(T) \quad (4-13)$$

donde k es la conductividad global y k_i es la conductividad térmica del componente i donde i (agua, carbohidratos, cenizas, lípidos, proteínas, y hielo si la temperatura se encuentra por debajo de la temperatura inicial de fusión). La fracción " x_i^V " corresponde a la fracción volumétrica de cada componente.

La cantidad de hielo que se forma se estimó según Miles (1974) como:

$$x_h = (x_w - x_b)\left(1 - \frac{T_f}{T}\right) \quad (4-14)$$

donde T_f es la temperatura de inicio de fusión del producto, x_h es la fracción másica de hielo, x_w es la fracción másica de agua en el alimento, y x_b es la fracción másica de agua ligada no congelada. La fracción de agua no congelada se estimó experimentalmente a partir del termograma de descongelación utilizando DSC. El cociente entre el calor de fusión del material, el cual se obtuvo integrando el pico endotérmico del termograma, y el calor de fusión del agua pura, 333.2 J/g (Weast y Astle, 1981) representa la fracción de agua congelada en el alimento. El x_b se calculó como la diferencia entre el contenido de agua total del alimento y el contenido de agua congelable (Sá y col., 1994).

La temperatura inicial de congelación T_f , se determinó experimentalmente a partir curvas de congelación utilizando el método de la tangente descrito en Fennema y col. (1973). La densidad del producto se obtuvo utilizando el modelo propuesto por Choi y Okos (1983):

$$\rho(T) = \frac{1}{\sum \frac{x_i}{\rho_i}} \quad (4-15)$$

donde $\rho(T)$ es la densidad global y ρ_i es la densidad del componente i donde i (agua, carbohidratos, cenizas, lípidos, proteínas, y hielo si la temperatura se encuentra por debajo de la temperatura inicial de fusión). Las fracción " x_i " corresponde a la fracción másica de cada componente.

El calor específico (C_p) de los repollitos Bruselas, la temperatura de congelación inicial, la cantidad de agua ligada y el calor latente de congelación del alimento, se midieron utilizando calorimetría diferencial de barrido (DSC) modelo Q100 controlado por un módulo TA 5000 (TA Instruments, New Castle, Delaware, USA). Se obtuvo el calor específico volumétrico multiplicando la densidad $\rho(T)$ por el $C_p(T)$. El cálculo de la entalpía volumétrica (H) se realizó integrando numéricamente el calor específico volumétrico tomando $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ como temperatura de referencia. De la misma forma se procedió con la conductividad térmica obteniendo la función de Kirchhoff (E) y con las funciones $E(H)$ y $T(H)$ necesarias para obtener la Ec. 12.

4.4.3. Determinación del coeficiente de transferencia de calor del medio usado para la congelación

Para estimar el coeficiente de transferencia de calor se utilizó una correlación que requiere la medición de la velocidad del aire en el túnel o cámara de congelación. En el caso específico de flujo de aire con velocidades $v < 5\text{ m/s}$ dentro del túnel de congelación puede aplicarse la ecuación (Earle, 1988):

$$h = 5.7 + 3.9 \cdot v \quad (4-16)$$

Donde h es el coeficiente de transferencia colórica en $\text{W/m}^2\text{ K}$ y v la velocidad del aire en unidades de m/s . La velocidad del aire refrigerante en el túnel se midió mediante un anemómetro de hilo caliente (TSI modelo 1650). En el proceso de congelación se usó un túnel de congelación industrial escala planta piloto. Las muestras que se usaron en esta experiencia consistieron en repollitos de Bruselas resultantes del proceso de pre-cocción.

4.4.4. Generación de la malla

El vegetal fue considerado como un sólido de revolución cuyo contorno irregular se obtuvo a través de imágenes digitales. Estas imágenes fueron luego importadas al

mallador para la discretización de los objetos en elementos triangulares. La Fig. 4-1 muestra una foto real del contorno irregular bidimensional, la malla generada y el sólido de revolución generado para facilitar visualizar el vegetal en tres dimensiones. Para la simulación computacional se usaron repollitos de Bruselas con las siguientes dimensiones en promedio: radio 1.6 cm (0.117 cm) y altura 4.84 cm (0.404 cm).

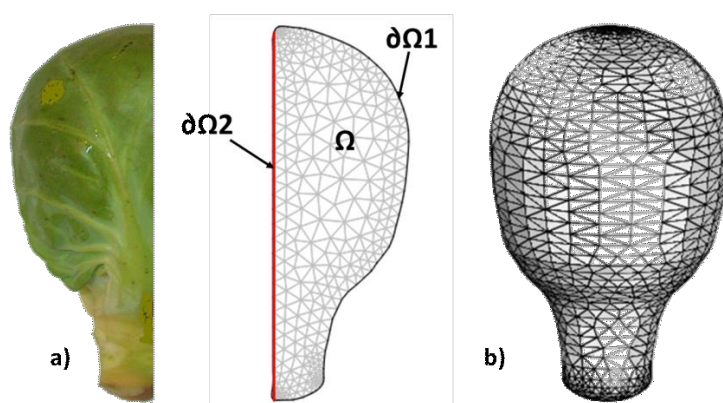


Figura 4-1-a) Imagen digital de una muestra de repollito de Bruselas junto con su contorno irregular y discretización en elementos triangulares b) Sólido de Revolución generado a partir de la sección irregular.

4.4.5. Validación experimental de las soluciones analíticas para el proceso de congelación

Se congelaron Repollitos de Bruselas precocidos y enfriados en un túnel de congelación en escala piloto, el cual permite obtener condiciones operativas similares a las de la industria, registrando la temperatura en función del tiempo en varios puntos del alimento y en el medio externo por medio de termocuplas conectadas a un adquisidor de datos (Testo 175, Testo AG, Alemania).

Para el caso del vegetal se simularon las historias térmicas en el proceso de congelación en el túnel, para esto se usó el código computacional desarrollado.

Se determinó el desvío estándar promedio (root mean square error= RMSE) usando la Ec. 4-17. con el fin de corroborar el proceso de validación.

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum (T_{exp} - T_{pred})^2}{N}} \quad (4-17)$$

donde N es el número de datos, T_{exp} fue la temperatura experimental y T_{pred} la predicha por la solución analítica en la simulación.

A continuación se pueden observar las muestras dispuestas (Repollitos de Bruselas

con termocuplas insertadas y conectadas al adquisidor) sobre una plancha metálica con espacios para que el aire de túnel entre en contacto con el vegetal en forma homogénea sobre toda la superficie (Figs. 4-2 a y b).

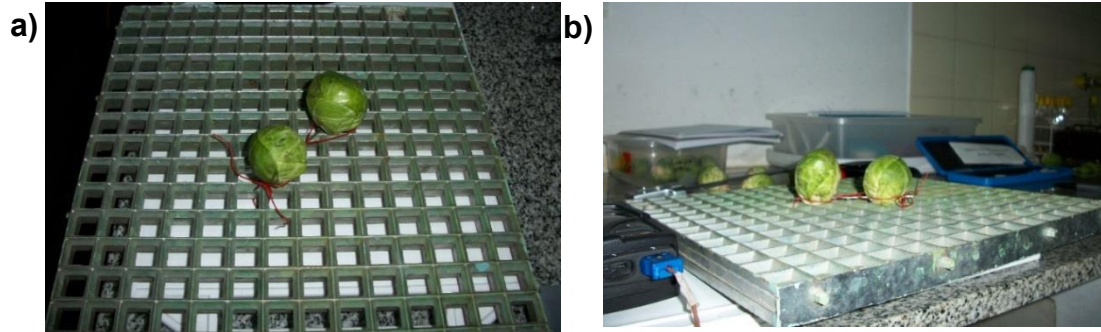


Figura 4-2 a. Fotografías de los Repollitos de Bruselas dispuestos sobre plancha metálica perforada antes de ingresar al túnel de congelación b. repollitos de Bruselas con termocuplas insertadas y conectadas con el adquisidor

4.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.5.1. Propiedades termofísicas y coeficiente de transferencia

La temperatura inicial de congelación obtenida fue de -1°C , según el método descrito por Fennema (1973). La fracción en base húmeda de agua ligada obtenida a través del termograma fue de $x_b=0.1843$ (g de agua ligada/g de alimento húmedo). Mediante la composición química del vegetal se logró estimar las curvas de conductividad y densidad en función de la temperatura (Choi y Okos, 1986) y se muestran a continuación:

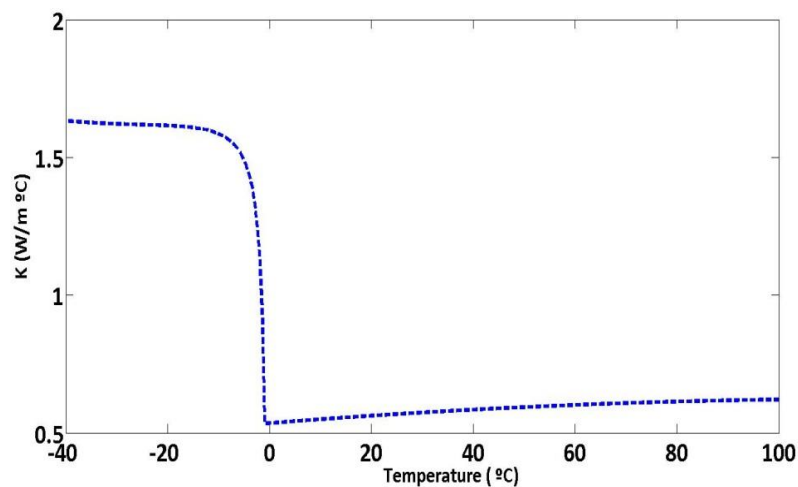


Fig. 4-3 Conductividad térmica del Repollito de Bruselas en función de la temperatura

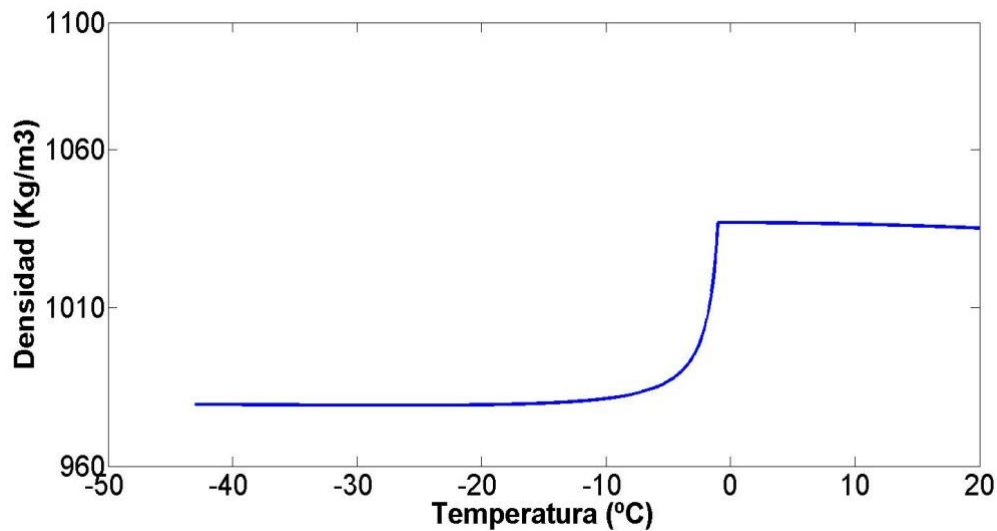


Fig. 4-4 Densidad del Repollito de Bruselas en función de la temperatura

El calor específico aparente en función de la temperatura obtenido mediante DSC se muestra en la Fig.4-5; el pico más notorio es debido a la congelación del agua del producto.

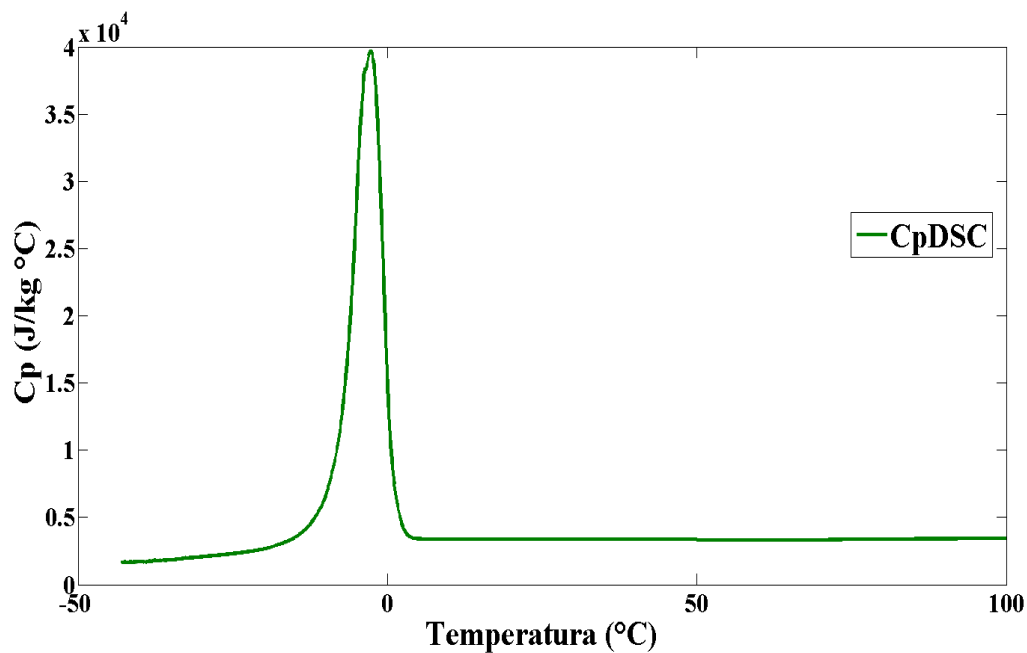


Fig. 4-5 Calor específico aparente obtenido por DSC del repollito de Bruselas

Se obtuvo el calor específico volumétrico multiplicando la densidad $\rho(T)$ por el $C_p(T)$. Una vez obtenidas las propiedades térmicas, C_p , k , y ρ se procedió a integrarlas en función de la temperatura para obtener la función Entalpía vs. Temperatura y la función de Kirchhoff vs. Temperatura, las cuales son necesarias para la simulación

numérica (Fig. 4-6).

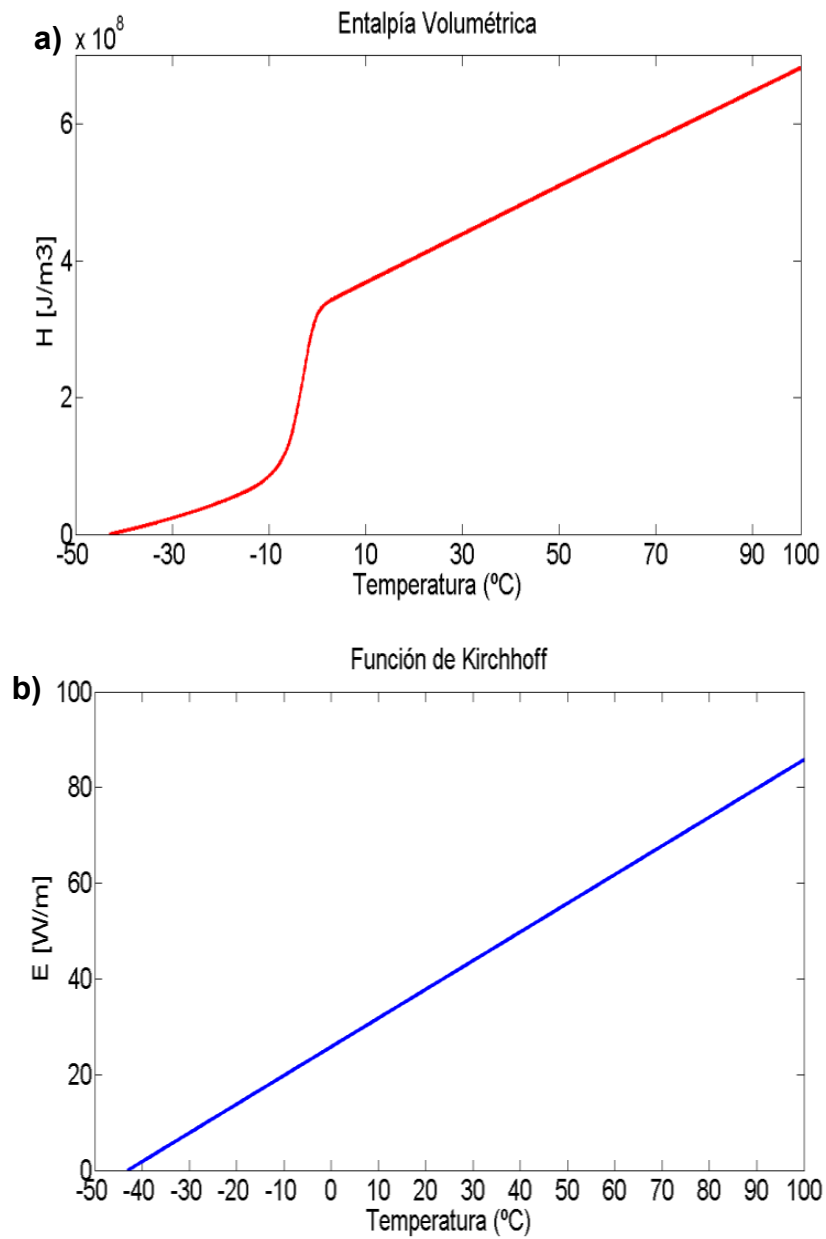


Fig. 4-6 a) Entalpía volumétrica; b) Función de Kirchhoff ambas en función de la temperatura

Además se calcularon las funciones $E(H)$ y $T(H)$ necesarias para obtener la Ec. 4-12. (Fig. 4-7 a y b).

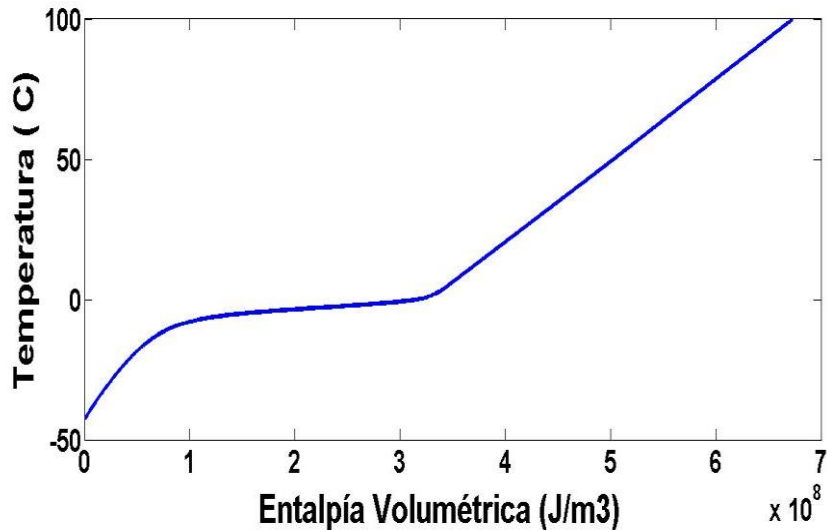


Fig. 4-7 a) Temperatura en función de la entalpía volumétrica

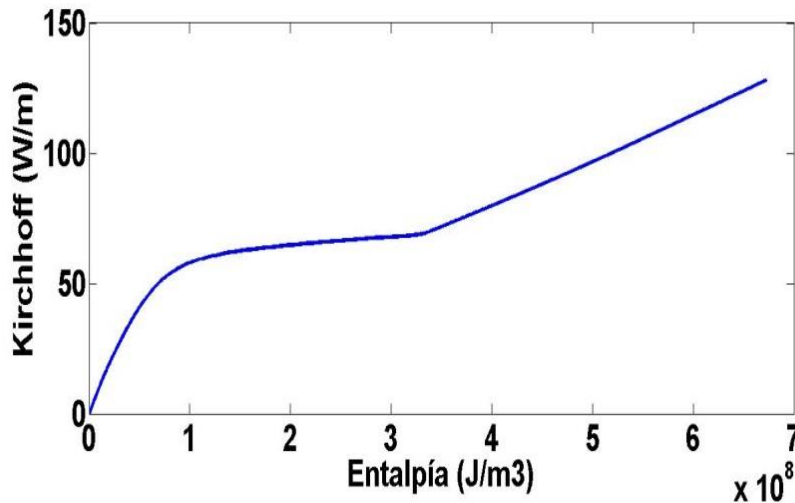


Fig. 4-7 b) Función de Kirchhoff en función de la Entalpía volumétrica

El coeficiente de transferencia de calor en el aire del túnel de congelación escala piloto estuvo comprendido entre 15-20 W/m²K (utilizando la ecuación 4-16 siendo las velocidades de aire medidas experimentalmente en promedio 2.5m/s). El valor de $h=19$ W/m²K fue el que proporcionaba el mejor ajuste en el caso de repollitos de Bruselas.

4.5.2. Aplicación del modelo numérico y validación para predecir tiempos de congelación

Para validar se compararon las historias térmicas obtenidas experimentalmente en la congelación con las temperaturas resultantes de las predicciones numéricas (se

hicieron experimentos por triplicado). El código computacional realizado en términos de entalpía y la función de Kirchhoff se muestra en el Anexo II.

La Fig.4-8 a y b) muestra los resultados obtenidos para el proceso de congelación en dos de los experimentos realizados donde existe una excelente concordancia entre las temperaturas predichas y obtenidas experimentalmente. El desvío estándar promedio (root mean square error= RMSE) calculado fue de 0.965°C.

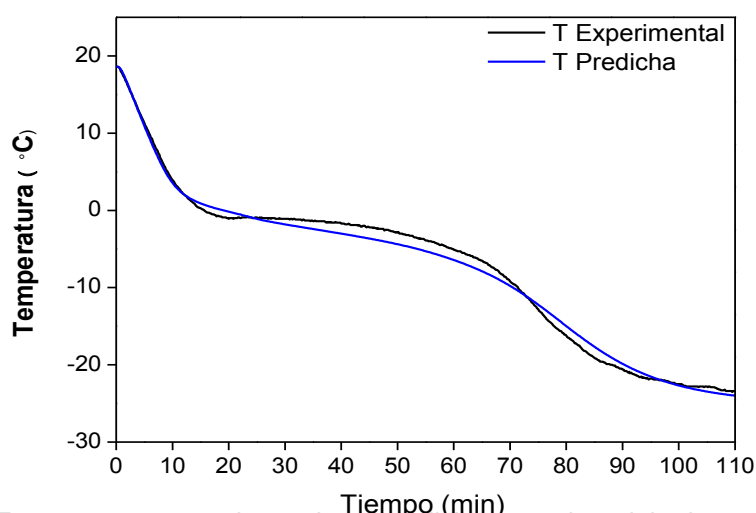


Fig.4-8 Temperaturas experimentales y predichas por el modelo durante la congelación. Posición de la termocupla $r=6$ mm, $z=23.8$ mm. Temperatura inicial del vegetal 19.4°C. Temperatura del aire -25°C

4.6. CONCLUSIONES PARCIALES

- Se logró determinar el calor específico aparente utilizando Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) y los coeficientes de transferencia calórica en la interfase usando el túnel de congelación a escala piloto. Con las propiedades térmicas determinadas (C_p , k , y ρ) se logró integrar en función de la temperatura las propiedades para obtener la función Entalpía vs. Temperatura y la función de Kirchhoff vs. Temperatura. Estos resultados son importantes para realizar los cambios de variable necesarios para simular los procesos de congelación.
- El modelo numérico desarrollado por el grupo de investigación permitió simular el proceso de congelación de los repollitos de Bruselas obteniendo un buen ajuste entre los resultados estimados numéricamente y los registrados experimentalmente.
- Los resultados del presente capítulo permiten calcular los tiempos de congelación de los vegetales, información muy útil para su procesamiento industrial.



CAPITULO 5

CORRELACIÓN DE PARÁMETROS DE CALIDAD CON LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DURANTE EL ALMACENAMIENTO CONGELADO



5. CORRELACIÓN DE PARÁMETROS DE CALIDAD CON LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DURANTE EL ALMACENAMIENTO CONGELADO

En este capítulo se muestran los cambios en diferentes parámetros de calidad (textura, color, aceptabilidad y variación de ácido ascórbico) que se producen en los repollitos de Bruselas pre-cocidos congelados durante 4 meses de almacenamiento. Además se estudió la relación del cambio de estos parámetros con la actividad residual de las enzimas peroxidasa y lipoxigenasa en el vegetal después de la inactivación enzimática y su evolución durante el almacenamiento congelado.

5.1. OBJETIVOS DEL CAPITULO

- I. Estudiar el almacenamiento congelado de repollitos de Bruselas con distintos tiempos de pre-cocción.
- II. Analizar y correlacionar los cambios en parámetros de calidad (color, textura), contenido de ácido ascórbico con la actividad enzimática residual (POD y LOX) antes y después del almacenamiento congelado.
- III. Realizar una evaluación sensorial de aceptabilidad general del producto.
- IV. Optimizar el proceso tecnológico que permita obtener vegetales pre-cocidos congelados de alta calidad.

5.2. REPOLLITOS DE BRUSELAS PRE-COCIDOS CONGELADOS

Como se ha mencionado la congelación viene acompañada de un tratamiento térmico corto que mejora el color y la textura de los vegetales, aumentando la vida útil durante el almacenamiento generalmente a -18°C. En el tratamiento térmico se inactivan las enzimas disminuyendo la velocidad de deterioro del vegetal (Canet , Alvarez , Luna , y Fernández , 2004; Jaiswal, Gupta, y Abu-Ghannam, 2012). La combinación de estos dos procesos genera productos pre-cocidos congelados los cuales para ser consumidos deben ser sometidos a una última etapa de calentamiento o descongelación. Es importante conocer los cambios que se presentan en la producción y almacenamiento de los vegetales pre-cocidos

congelados para minimizar las pérdidas nutricionales de productos listos para consumir, los cuales deben ser sensorial y nutricionalmente aceptables.

Los repollitos de Bruselas son vegetales estacionales, por lo tanto para asegurar su disponibilidad es conveniente recurrir a la congelación aumentando la disponibilidad durante todo el año (Olivera y col., 2008); de esta forma es posible asegurar que las personas puedan consumir estos vegetales y sus compuestos fitoquímicos benéficos para la salud como son los glucosinolatos.

Olivera y col., (2008) estudiaron el efecto del procesamiento térmico de repollitos de Bruselas después de ser congelado y almacenado durante 8 meses a -18°C , en general a estas condiciones concluyeron que la textura se ve altamente afectada debido a la combinación de procesos, por otro lado el color de la zona superficial muestra una coloración verde más intensa posterior al proceso de descongelación; a nivel de los compuestos nutricionalmente importantes el contenido de ácido ascórbico y flavonoides disminuyeron teniendo en cuenta que son compuestos hidrosolubles y termolábiles.

Dada la estructura de los repollitos de Bruselas y su forma similar a una esfera pueden presentar un color externo adecuado además de una textura aceptable posterior al tratamiento térmico, sin embargo, en la zona interior o apical la penetración térmica pudo haber sido insuficiente habiendo una actividad residual de POD y LOX alta. Esta actividad residual alta provocaría que durante el almacenamiento congelado las enzimas se mantengan activas y/o exista una reactivación enzimática que genere deterioro de color y calidad nutricional. En la actualidad no existen datos relacionando los cambios en parámetros de calidad en el interior del repollito (Zona apical) y la zona exterior, por tal motivo en este capítulo el objetivo fue evaluar los cambios de calidad en estas dos zonas del vegetal y relacionarlos con la actividad enzimática residual.

Otras investigaciones como las realizadas por Mazzeo y col., (2015), demuestran la importancia de estudiar los cambios de los compuestos fitoquímicos en vegetales especialmente verdes, estos autores indican que durante dos meses de almacenamiento congelado no se ven afectados compuestos como luteína, ácido ascórbico y flavonoides, por lo tanto concluyen que si el tratamiento de pre-cocción es adecuado junto con una buena congelación, los vegetales pre-cocidos congelados mantendrían un buen valor nutricional.

5.3. MATERIALES Y MÉTODOS

5.3.1. Ensayo de almacenamiento congelado de los repollitos pre-cocidos

Se realizó un ensayo de almacenamiento congelado de repollitos de Bruselas durante 4 meses. Para este fin se seleccionaron muestras del vegetal con un tamaño uniforme. El peso promedio de los repollitos fue de 17.8 g (DE=0.9 g), y sus dimensiones promedio fueron: ancho de 30.1 mm (1.1 mm) y 44.2 mm (1.0 mm) de altura. Los pre-tratamientos térmicos de los repollitos de Bruselas se realizaron en un baño de agua termostático Techne Modelo FTE-10DDC (Bibby-científica Ltda, Stone Staffordshire, Reino Unido) a 90 °C. Las muestras se retiraron del baño a 3, 6 y 10 minutos e inmediatamente se sumergieron en un baño de agua/hielo. Posteriormente se mantuvieron congelados durante 4 meses a -20°C.



Fig. 5-1 Fotografía del pre-tratamiento y de las muestras antes del almacenamiento congelado

Se realizó la determinación de la actividad enzimática para la peroxidasa (POD) y la lipoxigenasa (LOX), concentración de ácido ascórbico y parámetros de calidad (color y textura) al finalizar el almacenamiento congelado (T₄). Las muestras control del proceso consistió en vegetales almacenados en forma congelada (-20°C) durante los 4 meses sin tratamiento térmico previo (VST). Para todos los parámetros menos la textura se obtuvo datos tanto para el interior del repollito (zona apical) como para la zona exterior. Al finalizar el almacenamiento se realizó la evaluación de los atributos sensoriales.

5.3.2. Determinación de cambios en parámetros de calidad

Se determinaron diferentes parámetros: cambios de color, textura y concentración de ácido ascórbico. La metodología llevada a cabo fue la misma que la descrita en el capítulo 3 sección 3.3.7. Con el fin de comparar los cambios después del

almacenamiento congelado, los parámetros se analizaron con respecto al vegetal fresco. Los parámetros de calidad determinados fueron:

- Cambio de color: Se determinó partir de los parámetros de la escala CIELab (L^* , a^* y b^*) el ángulo hue (h°), y el índice de pardeamiento (IP), este último caracteriza el color marrón. El IP se calcula a partir de las Ecs. 5-1 y 5-2.

$$\%IP = \frac{[100(x-0.31)]}{0.172} \quad (5-1)$$

$$x = \frac{(a^*+1.75 L^*)}{(5.645 L^*+a^*-3.012 b^*)} \quad (5-2)$$

- Cambio en la textura: Se determinó la variación del porcentaje del coeficiente de elasticidad (%Ce) y la variación del porcentaje de fuerza máxima (%Fm).
- Variación en el porcentaje de ácido ascórbico residual (%AA): Se usó la metodología de cromatografía líquida de alta performance (HPLC) usando como fase móvil una solución isocrática de ácido metafosfórico al 0.5% (p/v) mezclada con acetonitrilo en una proporción de 93:7.

5.3.3. Evaluación sensorial

La evaluación sensorial se conoce como “la disciplina científica utilizada para evocar, medir e interpretar las reacciones a aquellas características de alimentos y otras sustancias, que son percibidas por los sentidos de la vista, olfato, gusto, tacto y oído” según la División de Evaluación sensorial del Instituto de Tecnólogos de Alimentos de los Estados Unidos (IFT). La evaluación sensorial involucra todos los sentidos, cubre una variedad de disciplinas científicas: psicología, estadística, tecnología de los alimentos y sociología. En la interpretación de los resultados, el análisis sensorial es el puente entre el mundo interno de una empresa y el mundo externo o sea el mercado. Para una empresa orientada al consumidor, el valor más importante es su reputación en proveer productos de calidad. El sabor (flavor) es la sensación que causa un alimento en la boca al ser percibido por los sentidos químicos (olfato, gusto y sentido químico común). El término “aromáticos” se emplea para indicar los constituyentes volátiles que se originan de un alimento en la boca y son percibidos por el sistema olfativo. La calidad organoléptica es importante ya que los consumidores demandan una buena apariencia del producto final.

En la evaluación sensorial el tipo de prueba que se seleccionó tuvo como objetivo medir la aceptabilidad sensorial del producto (Vegetal pre-cocido congelado). Se utiliza este método cuando el objetivo es comparar la preferencia entre más de dos

muestras. Esta prueba de aceptabilidad se llevó a cabo utilizando una escala hedónica de 9 puntos para determinar el nivel de aceptabilidad del producto final.

Estas pruebas han logrado una amplia popularidad desde que se inventó por primera vez en la década de 1940 por la División de Investigación Alimentaria de la Secretaría de Alimentación y el Instituto del Empaque de Chicago, Illinois (Peryam y Girardot, 1952).

Para los datos de la escala de 9 puntos se asignan valores del uno al nueve, uno corresponde para cuando el nivel de desagrado es alto; nueve se asigna para un alto nivel de agrado. Este tipo de pruebas se analiza mediante análisis de varianza y comparaciones de medias por parte de los atributos estudiados de las muestras (Lawless y Heymann, 2010).

Los atributos que se eligieron para evaluar son:

- Color interior y exterior del vegetal
- Aroma
- Textura
- Aceptabilidad general

En la ejecución de la prueba se usó un *carrier*, este consistió en una vinagreta comercial tipo Light. El uso de *carriers* se refiere a materiales alimenticios (especies, salsas, aderezos, otro tipo de alimentos, etc.) que forman una base o vehículo para la degustación del producto, por lo tanto estos son ingeridos y probados en la evaluación sensorial (Lawless y Heymann, 2010). El uso de un ingrediente acompañante es importante cuando el producto a evaluar no se consume directamente solo, por lo tanto es importante la aplicación del *carrier* (Lawless y Heymann, 2010). Este es el caso de los vegetales ya que habitualmente se consumen en ensaladas con algún tipo de aderezo o en otras preparaciones como tartas, guisos y salteados etc. La aplicación de un carrier debe contemplar que se pueden establecer falsos positivos por lo tanto el uso de estos debe ser rigurosamente cuidado ya que se debe contemplar que entre las muestras a analizar se produzca uniformidad.

5.3.3.1. Metodología

La metodología utilizada para medir la aceptabilidad sensorial de los repollitos de Bruselas pre-cocidos congelados es la siguiente:

5.3.3.2. Muestras analizadas

El análisis sensorial se basó en la evaluación de tres muestras: Vegetal fresco cocido (S) y vegetales pre-cocidos congelados con diferentes tiempos de tratamiento térmico (VC1 y VC2). La muestra (S) consistió en un repollito de Bruselas al cual se le realizó una pre-cocción en un baño termostático Techne modelo FTE-10DDC (Bibby-scientific Ltda, Stone Staffordshire, Reino Unido) a 90°C durante 10 minutos. Las otras dos muestras correspondieron a repollitos de Bruselas pre-cocidos congelados almacenados -20°C durante 4 meses; la pre-cocción se realizó en un baño termostático a 90°C durante 6 minutos (VC1) y 10 minutos (VC2) de calentamiento. El almacenamiento congelado se llevó a cabo en un freezer. Luego del almacenamiento las muestras congeladas se descongelaron a 4°C y se calentaron en el baño termostático a 90°C durante tres minutos.

En este ensayo no se trabajó con los repollitos de Bruselas pre-cocidas a 90°C durante 3 minutos, debido que después del almacenamiento congelado estas muestras presentaron deterioro en los parámetros de calidad por causa de la reactivación enzimática, este hecho se discute en profundidad en secciones posteriores. Las muestras se presentaron en bandejas descartables las cuales contienen las tres muestras de repollito codificadas cortadas en cuartos y con 2 mL de *carrier*; estas fueron ordenadas al azar. El consumidor debió evaluar el atributo que se menciona en la planilla de respuesta en una escala hedónica (Fig. 5-3).

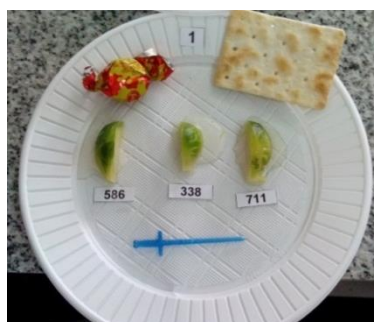


Fig. 5-2 Disposición de las muestras de repollitos pre-cocidos congelados para su análisis sensorial

5.3.3.3. Selección de los evaluadores

La prueba se realizó con 30 evaluadores (estudiantes, investigadores, personal de apoyo del CIDCA). El evaluador debió valorar la aceptabilidad general, de cada muestra y especificar el grado de aceptabilidad de los atributos.

5.3.3.4. Desarrollo de la prueba

- Los evaluadores probaron las tres muestras a ciegas (codificado con un número de tres dígitos) midiendo: aceptabilidad general, color interior y exterior, aroma y textura. Los números al azar de tres dígitos diferentes (586, 338 y 711) se seleccionaron de la Tabla A1. (*Números aleatorios del 1 al 9 agrupados de a tres, apunte de clase “Curso-taller de Análisis sensorial de Alimentos”*). Para esta prueba se utilizó el cuestionario presentado en la Fig 5-3.
- Cada evaluador debió probar un total 3 muestras ordenadas al azar, estas son: Vegetal fresco cocido (S) y vegetales pre-cocidos congelados con diferentes tiempos de pre-tratamiento térmicos (VC1 y VC2).
- La prueba se dividió en dos partes, la primera consistió en evaluar los atributos de color y aroma sin la necesidad de desgutar las muestras. La segunda parte consistió en probar la muestra y evaluar la textura y aceptabilidad global.
- Al momento de aplicar la prueba las personas comenzaron por la muestra que tenían a su izquierda evaluando sus características y continuaron en este orden hasta terminar de probar las tres muestras.
- Se neutralizaba el sabor entre muestras con agua y galletas sin sal.



Fig. 5-3 Fotografía de uno de los evaluadores efectuando la prueba sensorial de aceptabilidad

5.3.4. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el software OriginPro 8 (Origin Corporation, Northampton, MA, EE.UU.) y SYSTAT 12.0 (Systat Software, Evanston, IL, EE.UU.). Las pruebas de comparación se determinaron por medio del test de diferencia mínima de Fisher (LSD) usando un 95% de nivel de confianza.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CRIOTECNOLOGIA DE ALIMENTOS
MAESTRIA EN TECNOLOGIA E HIGIENE DE LOS ALIMENTOS



PRUEBA DE ACEPTABILIDAD DE REPOLLITOS DE BRUSELAS PRE-COCIDOS CONGELADOS

Evaluator N° _____ Fecha: _____
Nombre y apellido: _____ Edad: _____

Utilizando las siguientes escala hedónica, por favor evalúe la aceptabilidad de cada atributo para los repollitos de Bruselas el cual es un producto listo para consumir.

1. Prueba las muestras de izquierda a derecha, neutraliza entre con agua y galletas sin sal.
2. Primero evalúe los atributos de color (interno-externo) y aroma sin degustar las muestras.
3. Deguste y evalúe los atributos de textura y aceptabilidad general.

Muestra N° _____

Color interno	Me disgusta mucho	Me es indiferente	Me gusta mucho
Color exterior	Me disgusta mucho	Me es indiferente	Me gusta mucho
Aroma	Me disgusta mucho	Me es indiferente	Me gusta mucho
Textura	Me disgusta mucho	Me es indiferente	Me gusta mucho
Aceptabilidad general	Me disgusta mucho	Me es indiferente	Me gusta mucho

Fig. 5-4 Planilla de evaluación utilizada en la prueba de análisis sensorial de aceptabilidad por atributos de repollito pre-cocido congelado

5.4. Resultados y discusión

Con el fin de optimizar el procesamiento industrial de los repollitos pre-cocidos congelados, es necesario retomar los resultados obtenidos en el capítulo 3 sección

3.4.6. Estos muestran los cambios en los parámetros de calidad y la variación del contenido de enzima residual después de los pre-tratamientos térmicos llevados a cabo durante tres tiempos de proceso (3, 6 y 10 min).

En la Tabla 5-1 y 5-2 se muestra los resultados obtenidos de los repollitos de Bruselas sometidos a diferentes tiempos de tratamientos térmicos (3, 6 y 10 minutos) antes del almacenamiento congelado (T0) y después de cuatro meses de almacenamiento (T4). Para los dos casos los cambios obtenidos en el almacenamiento congelado se analizaron con respecto al vegetal fresco; además se presentan los resultados de la muestra control del proceso (vegetal almacenado durante 4 meses sin tratamiento térmico (VST)).

5.4.1. Variación en el porcentaje de actividad enzimática (%AE)

Las actividades enzimáticas de la peroxidasa (POD) y la lipoxigenasa (LOX) se determinaron para las muestras de los repollitos de Bruselas pre-cocidos congelados, tanto al inicio del almacenamiento congelado (T0) como al finalizar este después de los 4 meses (T4). Con estos resultados se obtuvo el porcentaje de actividad enzimática residual (%AE) comparando con el vegetal fresco.

Tal cual como se había mencionado en el capítulo 3 en la sección 3.7.6, para todos los tiempos de pre-tratamiento térmico se cumplió con lo sugerido por Williams y col., (1986) con respecto a alcanzar un %AE de POD entre 7.5- 11 % en repollitos de Bruselas. Como se observa en la Tabla 5-1 cuando el tratamiento térmico fue insuficiente y se aplicaron solamente 3 min de pre-cocción, antes de la congelación (T0) en la zona apical y en la zona exterior el %AE de POD fue de 7.3 y 2.7 respectivamente. Estos valores de actividad enzimática residual a pesar de ser menores al 11 % aumentaron notoriamente después del almacenamiento congelado (T4) siendo %AE mayor en la zona apical (83.5 %) que en la zona exterior (17.8 %). Este resultado se puede atribuir a la reactivación de POD con mayores valores de %AE en la zona apical del vegetal.

Los resultados obtenidos sometiendo el repollito a 6 y 10 min de pre-tratamiento térmico, no registraron diferencias significativas de %AE de POD aplicando el test Fisher ($P > 0.05$) para las muestras T0 y T4, ya que hubo una notoria inactivación la enzima no presentó reactivación por lo tanto no se produjeron alteraciones en la calidad dependientes de POD.

Tabla 5-1 Parámetros en zona apical del vegetal a diferentes tiempos de Pre-tratamiento térmico y después de almacenamiento congelado durante 4 meses. Actividad enzimática (%) de LOX y POD, n = 6. Ácido Ascórbico residual (%AA), n=2. Parámetros de color (L *, a *, b *, IP, ΔE y h°), n=10. Los valores entre paréntesis corresponden a desviaciones estándar. Diferentes letras en la misma columna para cada zona indican diferencias significativas entre las muestras (P<0.05)









t (min)		%AE		%AA	PARÁMETROS COLOR					Imagen Vegetal a T4
		LOX	POD		L*	a*	b*	h°	% IP	
3	T0	24.01 a (1.1)	7.3 a (0.9)	97.8 a (1)	48.1 a (5.5)	-12.7 a (1.2)	23.5 a (0.7)	118.4 a (2.4)	41.9 a (5.0)	
	T4	30.6 b (6.3)	83.5 b (1.6)	23.3 c (2.2)	67.1 b (3.8)	-2.5 d (0.7)	28.7 b (0.6)	95.1 b (1.4)	51.2 b (4.1)	
6	T0	19.5 c (2.2)	0.92 c (0.05)	93.2 a (4.1)	44.03 a (0.33)	-10.6 b (3.3)	17.9 c (1.2)	119.9 a (7.1)	30.3 c,d (6.6)	
	T4	22.9 a (1.0)	1.4 c (0.2)	73.1 d (4.9)	68.9 b,c (3.4)	-5.9 c (0.6)	24.2 a (2.0)	103.8 c (1.2)	35.4 d (4.7)	
10	T0	17.2 c (1.5)	0.12 c (0.03)	51.5 b (4.1)	44.1 a(4.0)	-10.1 b (1.2)	17.3 c (1.7)	120.2 a (2.9)	29.9 c (7.0)	
	T4	18.4 c (1.1)	0.37 c (0.03)	45.7 b (3.5)	71.9 c (2.5)	-6.1 c (1.6)	22.9 a (3.1)	105.3 c (4.4)	30.7 c,d (6.6)	
VST		112 d (12)	179 d (1,2)	21.3 c (6.6)	58.8 d (1.9)	-3-38 d (1.1)	37.8 d (3.7)	95.1 b (1.5)	91.47 e (5.9)	

Tabla 5-2 Parámetros en zona exterior del vegetal a diferentes tiempos de Pre-tratamiento térmico y después de almacenamiento congelado durante 4 meses. Actividad enzimática (%) de LOX y POD, n = 6. Ácido Ascórbico residual (%AA), n=2. Parámetros de color (L *, a *, b *, IP, ΔE y h°), n=10. Los valores entre paréntesis corresponden a desviaciones estándar. Diferentes letras en la misma columna para cada zona indican diferencias significativas entre las muestras (P<0.05)

t (min)		%AE		%AA	PARÁMETROS COLOR					Imagen Vegetal a T4
		LOX	POD		L*	a*	b*	h°	% IP	
3	T0	23.9 a,b (2.7)	2.7 a (0.3)	86.6 a (3.5)	45.7 a,b (2.9)	-12.1 a (1.4)	21.5 a (1.1)	119.3 a (2.2)	38.5 a (4.1)	
	T4	29.9 c (8.5)	17.8 c (1.1)	33.4 b (3.5)	47.2 b,d (2.8)	-9.6 b (1)	22.9 b (1.2)	112.7 b (1.4)	46.6 b (3.3)	
6	T0	21.9 a (2.0)	0.78 a,b (0.07)	78.2 a (1.1)	43.2 c (1.6)	-15.1 c (1.6)	22.8 a,b (5.6)	126.5 c (2.8)	36.6 a (9.5)	
	T4	26.8 b,c (1.2)	1.2 a,b (0.2)	63.7 c (5.8)	45.6 a,b (2.5)	-15.1 d (1.6)	23.0 b (1.2)	123.4 d (2.3)	37.6 a (4.2)	
10	T0	20.3 a(0.9)	0.11 b (0.01)	39.1 b (3.5)	41.8 c (1.1)	-17.6 c (0.7)	18.2 c (0.9)	134.2 e (1.7)	17.5 c (3.3)	
	T4	21.3 a(1.1)	0.34 b (0.03)	39.1 b (3.8)	43.8 a,d (1.8)	-15.2 d (1.5)	17.8 c (2.4)	130.7 f (4.5)	20.3 c (8.4)	
VST		117 d(11)	122 d(12)	22.9 d (8.1)	48.9 d (1.8)	-6.6 b (2.2)	28.1 c (1.0)	103.5 g (4.2)	69.1 d (6.9)	

Con un tratamiento térmico de 3 min en la zona externa del repollito, (Tabla 5.2) si bien se registró reactivación enzimática de POD esta fue menor que en la zona apical ; es decir la penetración del calor fue adecuada para inactivar las enzimas en la parte externa sin embargo, en la zona apical la cantidad de enzima inactivada fue insuficiente.

5.4.2. Reactivación enzimática posterior a los tratamientos térmicos

La reactivación de POD en brócoli ha sido reportada previamente en la literatura en sistemas modelos de laboratorio. En extractos purificados de la enzima se distinguieron diferentes isoenzimas pertenecientes a la familia de POD: POD ácida (A), POD neutra (N) y POD básica (B) (Neves y Lourenço, 1998; Thongsook y Barret, 2005; Thongsook y col., 2007).

En este capítulo se mostró que la reactivación enzimática se detectó en repollitos de Bruselas pre-cocidos, congelados y almacenados en los que finalmente se obtuvieron los extractos, en cambio en los trabajos reportados en literatura (citados anteriormente), la reactivación enzimática se detectó en extractos enzimáticos de brócoli que fueron calentados y se enfriaron en un baño de agua-hielo, incubándose a temperatura ambiente para finalmente medir la actividad enzimática.

La capacidad de POD para reactivarse después de un cierto grado de desnaturalización provocado por el calor, depende de varios factores:

- a) Condiciones de tratamiento.
- b) La especie de vegetal.
- c) Tipo de las isoenzimas presentes de una misma familia de enzimas.

Los resultados de Thongsook y Barret (2005) muestran que la reactivación es baja cuando los tratamientos térmicos son a bajas temperaturas durante tiempos largos (LTH) en todos los tipos de POD (A, N y B extraídas de brócoli).

En síntesis la reactivación enzimática es un problema que genera pérdida de calidad cuando existen tiempos cortos de tratamiento térmico (3 minutos de pre-cocción a 90°C). Thongsook y col., (2007) informaron que para los distintos tipos de POD presentes en el brócoli y rábano picante la temperatura donde se presentó reactivación de la POD ácida fue de 90°C, mientras que para la POD básica y neutra la temperatura fue aproximadamente entre 70 y 80°C, respectivamente.

El fenómeno de reactivación de POD es un proceso influenciado por los cambios en la estructura secundaria y terciaria de la proteína después del almacenamiento y

depende de varios factores. Thongsook y col., (2007) determinaron usando dicroísmo circular el % de estructura helicoidal que sufre la POD durante diferentes etapas de inactivación enzimática: tratamiento térmico, enfriamiento e incubación a 25 ° C. La disminución de la estructura helicoidal resultante después del tratamiento térmico se recuperó parcialmente con un menor grado de plegamiento estructural tras el enfriamiento y la incubación a 25°C. Esta recuperación de estructura de la enzima está directamente relacionada con un incremento en la actividad de la enzimática.

La absorbancia en el pico de Soret a 403 nm permite determinar la estructura terciaria alrededor del sitio activo de grupos hemo de una proteína de POD. Como se mencionó en el capítulo 2 la POD es una hemoproteína y en su estructura química presenta un cofactor que es un grupo hemo.

Thongsook y col., (2007) detectaron el aumento de la absorbancia a 403 nm después del enfriamiento de la POD tratada térmicamente indicando la reasociación del grupo hemo de la POD, por lo tanto se afirma que esta enzima presenta el poder de reactivarse siendo evidente este fenómeno según los datos experimentales obtenidos en este capítulo de tesis.

Con respecto a la variación del %AE de LOX según la Tabla 5-1 y 5-2 se observó que a los 10 min de pre-cocción T0 y T4 no existen diferencias significativas por lo tanto la enzima con estos tratamientos no experimentó el fenómeno de reactivación, por ende el vegetal no se vio afectado por la actividad enzimática de LOX.

Este resultado fue distinto para 6 y 3 minutos de tratamiento ya que existió un ligero aumento en el %AE después del almacenamiento congelado indicando que según el test Fisher ($P \geq 0.05$) existen diferencias entre T0 y T4. Los resultados expuestos permiten afirmar que existió un ligero fenómeno de reactivación de LOX con tratamientos de 3 y 6 minutos pero a comparación con la POD esto fue menos marcado.

El mayor % AE fue del 30% en la zona apical para T4 con 3 minutos de pre-cocción. Sólo en el caso en que el tratamiento térmico fue de 10 minutos la actividad LOX no mostró diferencias significativas entre las muestras antes y después del almacenamiento congelado. Hasta el momento no se ha indicado en literatura que la LOX tenga al igual que la POD el poder de reactivarse o regenerarse, un ejemplo fue el estudio realizado por Bahçeci, y col., (2005); estos investigadores estudiaron el cambio de la LOX en chauchas (*Green Beans*) durante 9 meses de almacenamiento

congelado indicando que no existen variaciones en el %AE para la LOX.

Según los resultados obtenidos se puede indicar que el tratamiento aplicado (90°C-3 minutos y 6 minutos) es insuficiente para lograr inactivar un nivel adecuado de enzima y por ende sigue existiendo actividad durante el almacenamiento. Para los VST (vegetal almacenado durante 4 meses sin tratamiento térmico) se observó que los %AE para las dos enzimas fue superior al vegetal fresco.

Esto evidencia la importancia de realizar un adecuado tratamiento térmico antes del almacenamiento congelado ya que las enzimas a temperaturas por debajo de -20°C continúan sus reacciones bioquímicas. Con respecto al deterioro del vegetal y la acción residual de estas enzimas se discutirá en las próximas secciones.

5.4.3. Variación en el porcentaje de ácido ascórbico residual (%AA)

El ácido ascórbico (AA) es un compuesto con actividad antioxidante que participa en muchas funciones bioquímicas, se caracteriza por ser termolábil, por lo tanto se utiliza como parámetro de calidad por ser un bio-componente importante en atributos sensoriales y nutritivos. Su concentración disminuye durante el almacenamiento congelado, dependiendo de las condiciones del mismo, tales como la temperatura, el contenido en oxígeno, la luz y el tiempo (Torregrosa-Verdú, 2006).

El contenido de AA se cuantificó por cromatografía líquida de alta performance (HPLC). A partir de la relación lineal obtenida entre el área bajo la curva de los picos del estándar en los cromatogramas y las distintas concentraciones de ácido ascórbico, se obtuvo la ecuación para calcular la concentración de AA en las muestras de vegetales. La curva de calibración para determinar el contenido de AA después del almacenamiento congelado se muestra en la Fig.5-5.

Si bien en la Fig. 3.19 del capítulo 3 se presentó una curva de calibración para AA, debe tenerse en cuenta que las determinaciones realizadas en los vegetales precocidos, congelados y almacenados se realizaron 6 meses después de las correspondientes a las muestras precocidas del Cap.3 por lo que se requirió volver a realizar la calibración del método de HPLC.

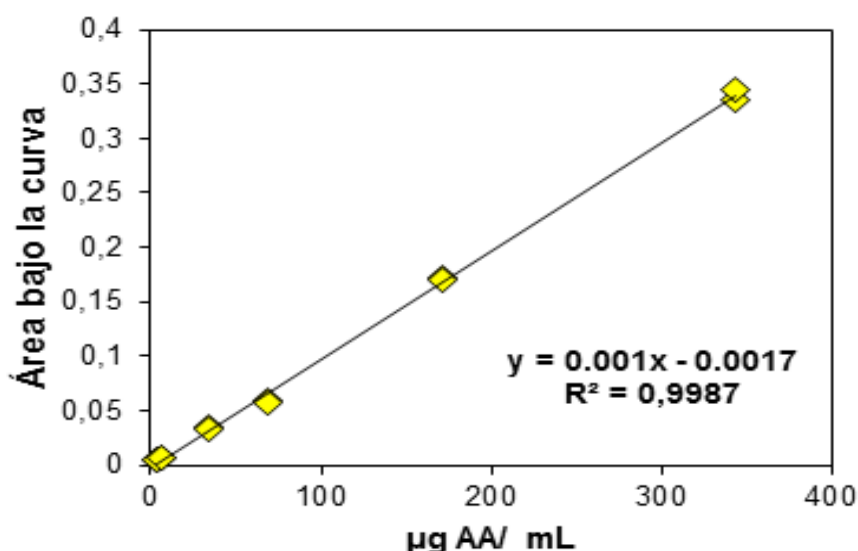


Fig. 5-5 Curva de calibración de ácido ascórbico obtenidas por HPLC: a. Inicio de almacenamiento (T_0), b. fin del almacenamiento (T_4). Los símbolos corresponden a los datos experimentales y la línea a la regresión lineal

Con las curvas de calibración se cuantificó la variación de AA a los distintos tiempos de almacenamiento. Según las Tablas 5.1 y 5.2 se puede observar cómo disminuye la concentración de AA después del procesamiento térmico y almacenamiento congelado. Estos datos se presentan en la Fig.5-6, en la que se muestra el %AA en la zona apical (Fig. 5.6.a) y exterior (Fig. 5.6.b) del repollito tratado térmicamente durante distintos tiempos (3, 6, 10 min) antes (T_0) y después del almacenamiento congelado (T_4).

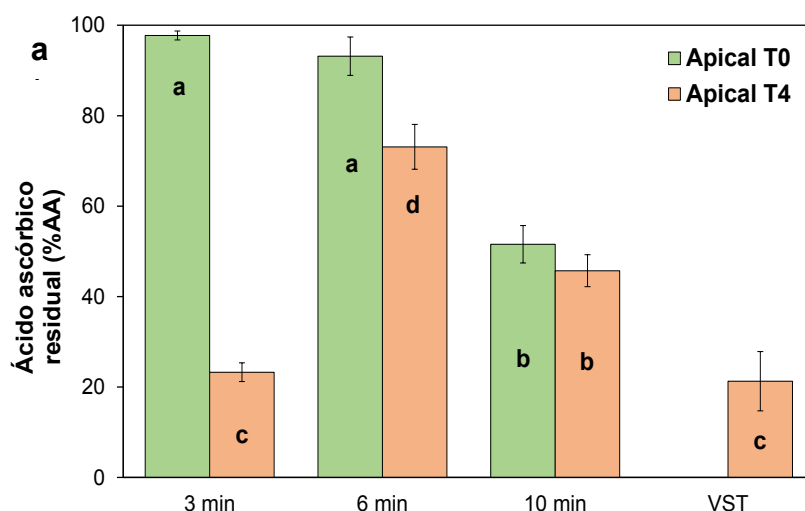


Fig. 5-6 a) Las barras indican la variación del porcentaje de ácido ascórbico residual (%AA) con respecto al tiempo de pre-tratamiento térmico (3, 6, 10 min) de la Zona apical;. Los % antes del almacenamiento congelado (T_0) se indican en verde y después y después de 4 meses de almacenamiento congelado (T_4) en naranja. VST corresponde a las muestras almacenadas congeladas sin previo tratamiento térmico. Para cada zona diferentes letras en las barras indican diferencias significativas entre las muestras ($P < 0.05$)

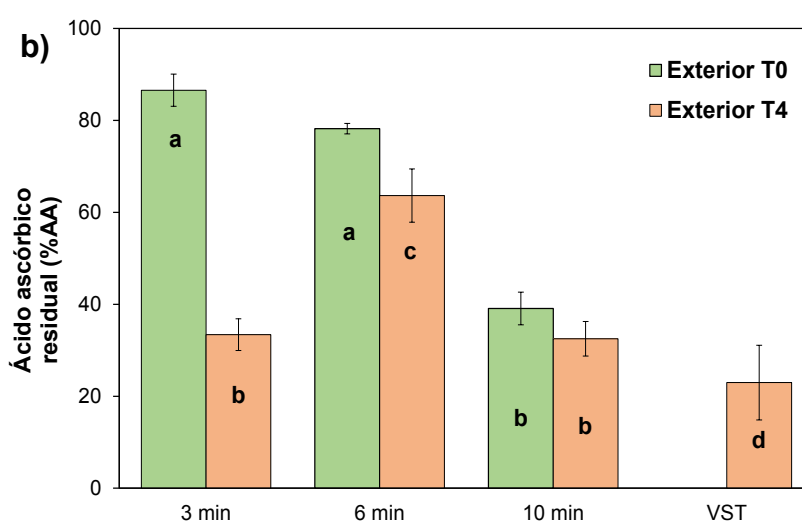


Fig. 5-7 b) Las barras indican la variación del porcentaje de ácido ascórbico residual (%AA) con respecto al tiempo de pre-tratamiento térmico (3, 6, 10 min) de la Zona exterior. Los % antes del almacenamiento congelado (T0) se indican en verde y después y después de 4 meses de almacenamiento congelado (T4) en naranja. VST corresponde a las muestras almacenadas congeladas sin previo tratamiento térmico. Para cada zona diferentes letras en las barras indican diferencias significativas entre las muestras ($P < 0.05$)

Es importante destacar que a 6 y 10 minutos de tratamiento térmico, en la zona apical se registran concentraciones de AA (después del almacenamiento congelado) mayores que para el tratamiento más corto de 3 minutos. Este resultado aparentemente anómalo se explica teniendo en cuenta que la POD con 3 min de tratamiento térmico se reactiva y actúa oxidando el AA. El AA degradado en los vegetales genera peróxido el cual es un sustrato activo para que la POD actúe generando las alteraciones típicas del deterioro (Brewer y Begum, 2003).

Si se comparan los tratamientos de 6 y 10 minutos el más conveniente sería el de 6 minutos ya que permite mantener los niveles más altos de AA tanto para la zona apical como para la externa.

En las muestras de repollitos almacenadas en forma congelada sin tratamiento térmico (VST), después de cuatro meses de almacenamiento congelado se redujo el %AA residual con respecto al vegetal fresco en una alta proporción debido a que no hubo inactivación enzimática térmica; esto permitió que aún por debajo de -20°C se produzcan las reacciones de deterioro.

En forma similar el tratamiento térmico de 3 min fue insuficiente ya que en el caso de la zona apical la concentración residual de AA después del almacenamiento congelado (T4) no presentaron diferencias estadísticamente significativas ($P > 0.05$) con las del vegetal no tratado.

Gökmen y col., (2000) reportaron que para arvejas sin tratamiento térmico de inactivación enzimática o tratamiento insuficiente, la degradación de AA era alta debido a la acción de las enzimas oxidativas endógenas de los vegetales como el ascórbico oxidasa y POD. Por eso resulta de gran importancia optimizar el pre-tratamiento térmico ya que se puede evitar una pérdida sustancial de compuestos termolábiles como el AA durante el procesamiento, además de asegurar la correcta inactivación de la enzima POD.

Resulta interesante recalcar que el tiempo de procesamiento térmico de 6 minutos alcanzó la mayor concentración de %AA luego del almacenamiento congelado (superior al 60%AA), en ambas zonas (zona apical y externa del vegetal). A este tiempo de procesamiento no se observó una reactivación de la POD siendo su valor inferior al 2%. En el caso de un tratamiento térmico de 10 minutos tampoco hubo una reactivación de POD sin embargo la concentración de AA había disminuido apreciable ($P < 0.05$) respecto al %AA del vegetal fresco luego del tratamiento térmico, demostrando la naturaleza termosensible de este compuesto.

Sheu y Chen (1991) afirmaron que durante el almacenamiento congelado de vegetales pre-cocidos el contenido de AA disminuye lentamente. Gonçalves y col., (2011) estudiaron la cinética de degradación del AA en brócoli, donde se observó que en condiciones isotérmicas de almacenamiento (-18°C) los cambios más drásticos en el contenido de AA ocurren durante los primeros 55 días. Estos mismos resultados fueron reportados para arvejas, espinacas, chauchas y okras (Giannakourou y Taoukis, 2009).

González-Hidalgo y col., (2018) encontraron que para brócoli pre-cocido durante 2 minutos a 97°C y congelado a -20°C existió una buena cantidad residual de AA (alrededor del 69%) luego de un día de almacenamiento. Asimismo, bajo las mismas condiciones la concentración total de glucosinolatos como la glucorafarina e iso-glucosinolatos no se vieron afectados comparada con la del vegetal fresco.

Por el contrario, el procesamiento térmico potenció la biodisponibilidad de estos metabolitos con características bio-activas demostrando que el proceso de congelación logró mantener las propiedades nutricionales de los vegetales.

Murcia y col., (2000) reportaron que existe una disminución drástica en el contenido de AA para brócoli al aumentar el tiempo de exposición en el tratamiento de pre-cocción; sometiendo el vegetal a una temperatura de 90°C durante más de 15 minutos existe una pérdida comprendida entre 40 y 50 % de AA. Una de las causas

de pérdida del AA se debe a la ruptura de los tejidos vegetales por acción del calentamiento en agua, generando cambios de permeabilidad y una lixiviación del compuesto AA (Olivera y col., 2008).

5.4.4. Variación del color

Uno de los indicadores más evidentes que muestran las alteraciones de un producto es el color ya que el deterioro de un alimento es frecuentemente acompañado por cambios de este atributo. En las Tablas 5-1 y 5-2 se detallan los parámetros de color obtenidos en el espacio CIELab para ser comparados con la AE% residual después del almacenamiento congelado.

Como se ha mencionado las alteraciones en el color en los vegetales se produce por enzimas oxidoreductasas como la POD y polifenoloxidasas (PPO), siendo útil estudiar la PPO sólo cuando en el procesamiento del vegetal están incluidas operaciones mecánicas como el cortado, las cuales permiten el contacto del oxígeno con compuestos fenólicos causando el pardeamiento enzimático (Adams, 2010).

Como este tipo de operaciones no se llevaron a cabo para el procesamiento de los repollitos de Bruselas no se determinó la actividad enzimática para la PPO.

El % del índice de pardeamiento (%IP) se utiliza frecuentemente en literatura y está relacionado con los parámetros de color (a^* , b^* y L^*) (Guerrero y col., 1996; Schebor y col., 1999; Jalaei y col., 2011). Este parámetro es clave para explicar el comportamiento que se presentó en las muestras de repollitos de Bruselas durante el almacenamiento congelado, especialmente en la zona apical ya que en la zona exterior la presencia de tonalidades verdes no reflejan el pardeamiento interno del vegetal. En la Fig. 5-7 se muestra la variación del %IP para los repollitos acompañados de imágenes después del almacenamiento congelado a diferentes tiempos de tratamiento térmico en cada una de las dos zonas estudiadas (Apical y Zona exterior).

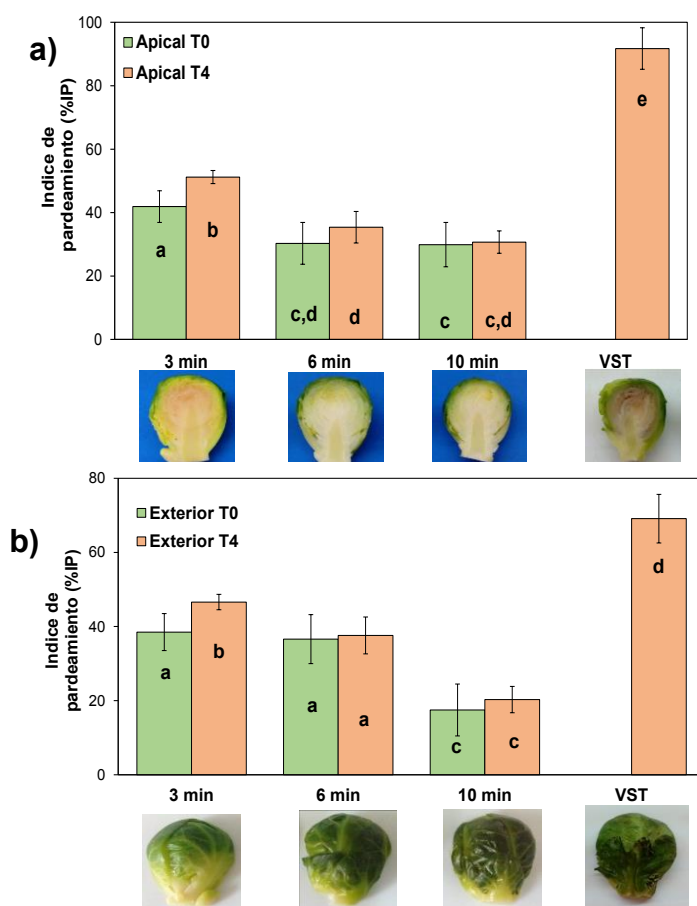


Fig. 5-8 Las barras indican la variación del índice de pardeamiento (%IP) con respecto al tiempo de pre-tratamiento térmico (3,6,10 min). a) zona apical; b) zona exterior. Los % antes del almacenamiento congelado (T0) se indican en verde y después de 4 meses de almacenamiento congelado (T4) en naranja. VST corresponde a las muestras almacenadas congeladas sin previo tratamiento térmico. Las imágenes corresponden a los vegetales después del amacenamente congelado a diferentes tiempos de pre-tratamiento térmico y VST. Diferentes letras en las barras para cada zona indican diferencias significativas entre las muestras ($P < 0.05$)

Como se discutió anteriormente el %AE residual de POD en la zona apical fue alta para los vegetales sin tratamiento térmico (VST) y las muestras después de los 3 min de tratamiento al finalizar el almacenamiento congelado (T4); este comportamiento está relacionado con la aparición de pardeamiento enzimático tal cual se ve en la imagen de la Fig 5-7a. En estas dos condiciones de ensayo (VST y 3 min) a T4 el %IP correlaciona con la presencia de colores marrones característicos del pardeamiento causado por acción de la POD (Velasco y col., 1989; Williams y col., 1986).

Según la Fig.5.7 al inicio y al final del almacenamiento congelado en los tratamientos térmicos más prolongados (6 y 10 min) el %IP no presenta diferencias significativas

según el test Fisher ($P < 0.05$); esto quiere decir que no se presentaron cambios en la coloración en la zona apical del vegetal pudiendo corroborar que el tiempo óptimo del proceso es de 6 minutos. Por el contrario a los 3 minutos de tratamiento térmico en T0 y T4 se presentan diferencias significativas por causa de la reactivación de la POD.

En la Tabla 5-1 se observa el cambio del parámetro L^* en la zona apical, este parámetro indica la luminosidad. La disminución del parámetro L^* está relacionada con el aumento del %IP, por lo tanto las muestras se vuelven más opacas porque en el interior del vegetal se presentan coloraciones características del pardeamiento efectuado por la peroxidasa que se reactiva.

El ángulo hue (ángulo matiz, $^{\circ}h$) varía entre 0° y 360° . El h° va desde 0° (rojo) hasta 60° (amarillo), 120° (verde), 240° (azul). Según la Fig.5-8 en T0 para las dos zonas del vegetal el $^{\circ}h$ aumentó, esto se discutió en el capítulo 3 sección 3.7.6. Este parámetro es especialmente útil para notar diferencias en la zona externa del Repollito.

De esta observación se puede afirmar que el procesamiento térmico modifica la coloración verde por la conversión de clorofila a feofitina y la consecuente degradación a feoforbidos y clorinas (Castelfranco y Beale, 1981; Bahçeci y col., 2005) causando la aparición de tonos pardos o verdes olivas. Después del almacenamiento congelado $^{\circ}h$ desciende en las dos zonas, esto demuestra que el múltiple procesamiento (pre-cocción, enfriamiento, congelación, y descongelación) afecta significativamente la coloración verde del vegetal.

Olivera y col., (2008) reportaron resultados similares a los obtenidos; ellos indicaron que el $^{\circ}h$ se ve alterado en la parte exterior del repollito de Bruselas sometido a diferentes tratamientos térmicos y almacenado en forma congelada durante 8 meses; los resultados se acompañaron con un cambio del parámetro a^* con respecto al producto fresco. Mazzeo y col., (2015) estudiaron los efectos en el cambio de color de vegetales “Verdes” después de procesamiento térmico y almacenamiento congelado durante 2 meses; estos investigadores encontraron que para el caso de tallos de espárragos se observó una disminución de L^* , aumento de h° y la no aparición de colores amarillos (bajo b^*) en comparación con muestras frescas del vegetal; esto mismo fue reportado por Begum y Brewer (1997).

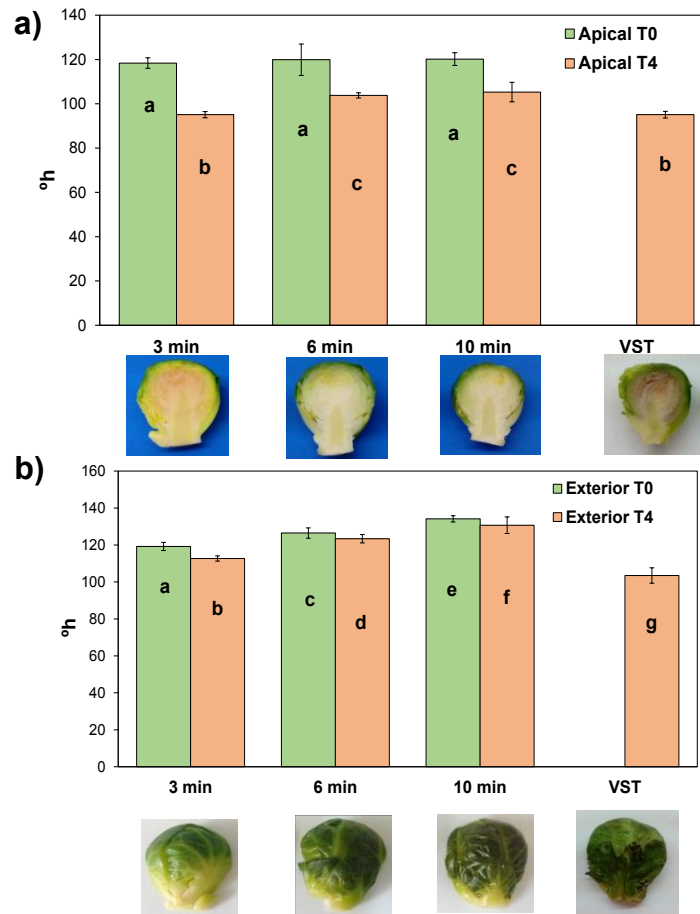


Fig. 5-9 Las barras indican la variación del ángulo hue (°h) con respecto al tiempo de pre-tratamiento térmico (3,6,10 min). a) zona apical; b) zona exterior. Los % antes del almacenamiento congelado (T0) se indican en verde y después de 4 meses de almacenamiento congelado (T4) en naranja. VST corresponde a las muestras almacenadas congeladas sin previo tratamiento térmico. Las imágenes corresponden a los vegetales después del amacenamiento congelado a diferentes tiempos de pre-tratamiento térmico y VST. Diferentes letras en las barras para cada zona indican diferencias significativas entre las muestras ($P < 0.05$)

5.4.5. Variación de parámetros de textura

Las diferentes operaciones llevadas a cabo para la producción de repollitos de Bruselas pre-cocidos congelados generan cambios significativos en la textura si se compara con respecto a un vegetal sin procesar. Como se comentó en el Capítulo 3 sección 3.4.6 la pre-cocción genera cambios estructurales por causa de la lixiviación de agua desde las paredes celulares hacia el exterior. A este hecho se suma formación de cristales de hielo por la congelación los cuales afectan la estructura celular generando daño mecánico en los tejidos. La suma de las etapas conlleva a cambios irreversibles de la textura (Kidmose y Martens, 1999) afectando la apreciación sensorial del producto.

En la Fig.5-9 se presentan los resultados de los ensayos de penetración con Texturómetro obtenidos para las muestras de los repollitos de Bruselas antes y después del almacenamiento congelado para diferentes tiempos de procesamiento térmico. Para los parámetros evaluados se evidencia que la fuerza máxima disminuye tanto para los vegetales sometidos al tratamiento térmico (T0) como para los almacenados durante los cuatro meses (T4). Los resultados indican que a medida que aumenta el tiempo de tratamiento térmico, se va reduciendo la fuerza máxima durante el almacenamiento, indicando que el vegetal es más blando. También se determinó el % de fuerza máxima (%Fm) y coeficiente de elasticidad (%Ce) para repollitos almacenados sin tratamiento térmico, siendo estos resultados 75.5% (9.6) y 10.4 (1.9) % respectivamente.

Olivera y col., (2008) reportaron que para repollitos de Bruselas pre-cocidos congelados después de 8 meses de almacenamiento existe cambios notorios en la fuerza máxima con respecto al vegetal fresco, siendo este cambio casi del 86 %: En nuestro caso este cambio fue de 69.52 % para 6 min de pre-tratamiento térmico después del almacenamiento congelado.

El coeficiente de elasticidad es considerado como un índice de la rigidez de la muestra (Nguyen y col., 2010). Según la Fig.5-9 para el coeficiente de elasticidad (%Ce) sucede lo mismo que en %Fm; valores menores en el coeficiente de elasticidad indican que se necesita menos fuerza para provocar la deformación y por lo tanto su estructura es menos rígida (Vargas y col., 2000). Para las muestras congeladas y almacenadas (T4) no se encontraron diferencias significativas en este parámetro según el test de comparación realizado.

González-Hidalgo y col., (2018) mostraron que para el caso del brócoli pre-cocido congelado después del almacenamiento congelado a -20°C la elasticidad y firmeza disminuye significativamente con respecto al vegetal fresco. Todos estos cambios en la textura se deben a la pérdida de firmeza por causa del daño sufrido por la membrana celular lo cual genera la despolimerización y solubilización de polisacáridos segmentarios como las pectinas (Greve y col., 1994).

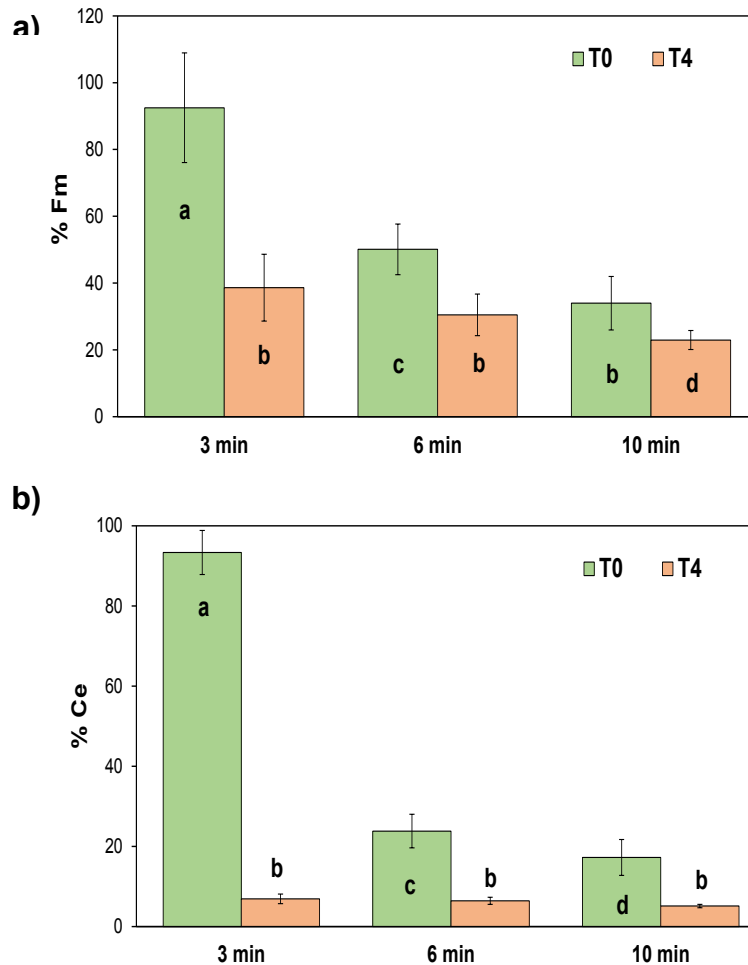


Fig. 5-10 Las barras indican la variación de parámetros de textura con respecto al tiempo de pre-tratamiento térmico (3,6,10 min). a) Fuerza máxima (%Fm); b). Coeficiente de elasticidad (%Ce). Los % antes del almacenamiento congelado (T0) se indican en verde y después y después de 4 meses de almacenamiento congelado (T4) en naranja. Diferentes letras en las barras para cada zona indican diferencias significativas entre las muestras ($P < 0.05$)

5.4.6. Resultados de la evaluación sensorial

Sensorialmente se evaluó la preferencia del producto por parte de un potencial consumidor. En este tipo de determinaciones se debe tener presente que para el caso de los vegetales existen ciertos factores personales que influyen el consumo tales como hábitos de vida, conductas y perfiles de alimentación, naturaleza socioeconómica, contexto ambiental y disponibilidad en el hogar (Tudoran y col., 2009). Este último factor es importante cuando se entiende que en la actualidad las prácticas culinarias están enmarcadas en usar ingredientes a lo largo del año sin importar su estacionalidad, además de la reducción de tiempos de cocción. Por esa

razón los vegetales pre-cocidos congelados son una alternativa ya que sensorialmente se caracterizan por generar en los consumidores la satisfacción de ser productos saludables manteniendo características parecidas a los productos frescos cocidos, sumado a esto son fáciles de consumir ya que se adaptan a las necesidades del mercado (Viteri, 2003).

Teniendo en cuenta lo anterior se realizó la evaluación sensorial de los repollitos de Bruselas pre-cocidos congelados y almacenados durante 4 meses a -20 °C.

En el ensayo de evaluación sensorial no se incluyeron las muestras sometidas a 3 minutos de pre-cocción antes de ser congeladas, ya que de acuerdo a los resultados previamente analizados éstas presentaron al finalizar el almacenamiento características no adecuadas en comparación con las muestras sometidas a 6 y 10 minutos.

En esta prueba sensorial se comparó la aceptabilidad general de un vegetal fresco cocido (S) y vegetales pre-cocidos durante 6 y 10 minutos (VC1=6 minuto y VC2=10 minutos), posteriormente congelados y almacenados durante 4 meses.

Para llevar a cabo la evaluación sensorial las muestras congeladas se sometieron a un calentamiento tal cual como se menciona en la sección 5.3.3.

En la Fig.5-10 se muestra un gráfico radial donde se representan los resultados de las propiedades sensoriales evaluadas para los repollitos de Bruselas pre-cocidos congelados.

Se puede observar que las muestras presentaron puntajes comprendidos entre 5 y 8 de la escala hedónica usada. La muestra VC2 obtuvo la puntuación más alta ya que la misma resultó más blanda y fue preferida por los consumidores.

En la Tabla 5-3 se presentan los valores medios de las respuestas dadas por los consumidores, para la mayoría de los descriptores indagados, los evaluadores no encontraron diferencias significativas entre el vegetal pre-cocido congelado fresco y los vegetales pre-cocidos congelados a diferentes tiempos (6 y 10 minutos)

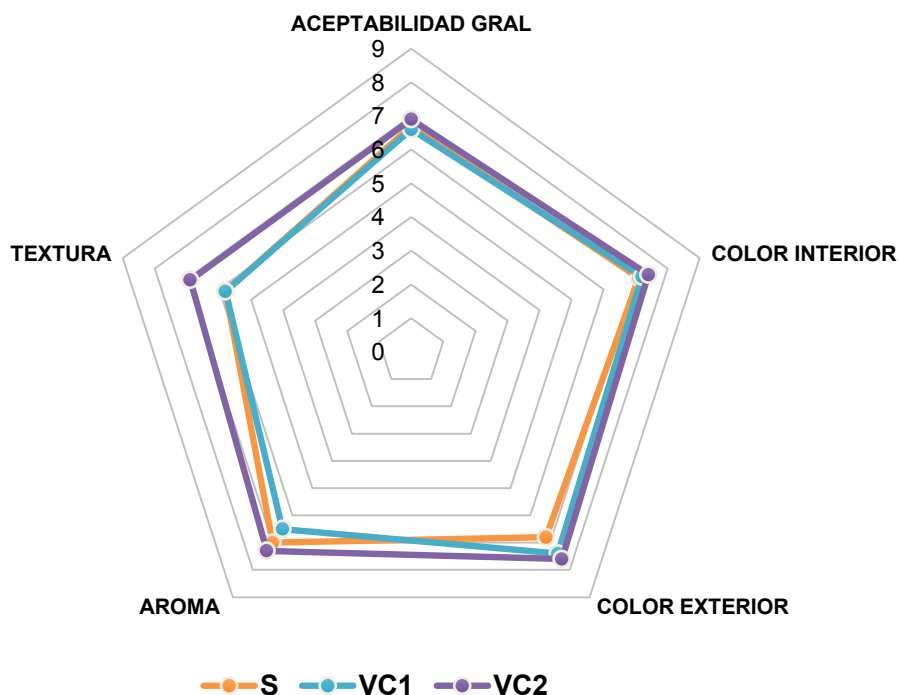


Fig. 5-11 Diagrama radial de los resultados obtenidos para cada atributo en la evaluación sensorial de los repollitos de Bruselas pre-cocidos congelados. Las abreviaturas corresponden a: S= vegetal fresco cocido, vegetales pre-cocidos congelados y almacenados durante 4 meses, los tiempos de pre-cocción fueron 6 y 10 minutos (VC1=6 minutos y VC2=10 minutos).

El único descriptor que presenta diferencias es el color exterior ya que la muestra VC2 es diferente a los demás, habiendo obtenido la puntuación mayor. Este resultado se puede atribuir a que la muestra VC2 al estar más tiempo sometido al tratamiento térmico muestra un color verde más intenso que es atractivo para el consumidor.

Un resultado importante para destacar es el aroma, debido a que entre las tres muestras analizadas no se detectaron diferencias significativas; además los resultados en promedio dan una puntuación de 6.9, esto quiere decir que para los evaluadores los repollitos de Bruselas no presentaron aroma desagradable atribuible a los compuestos secundarios que se generan el acción enzimática de la LOX.

Los hidroperóxidos generados por esta enzima suelen ser transformados en compuestos volátiles como el hexanal; por tal motivo se puede afirmar que los repollitos pre-cocidos congelados y almacenados cumplieron con este parámetro de calidad.

Tabla 5-3 Resultados obtenidos del análisis sensorial para el vegetal fresco cocido (S) y vegetales pre-cocidos congelados a diferentes tiempos de tratamiento térmicos (VC1 y VC2). Valores con misma letra por columna no presentan diferencias significativas según test Fisher ($P < 0.05$). $n=30$

	Aceptabilidad Gral	Color Interior	Color exterior	Aroma	Textura
S	6.7a (2.1)	7.1a (2.4)	6.8a (2.4)	7.0a (2.1)	5.8a (2.6)
VC1	6.6a (1.1)	7.2a (2.2)	7.4a (2.2)	6.5a (1.1)	5.8a (2.1)
VC2	6.9a (2.4)	7.4a (2.3)	7.6b (1.2)	7.3a (1.3)	6.9a (2.6)

Los repollitos de Bruselas después de la cocción son ricos en aldehídos volátiles y compuestos azufrados, esto es lo que le confiere las características sensoriales a las crucíferas. Hassen y col., (1997) reportaron que sensorialmente el brócoli posee un gusto y aroma característico que se intensifica con el aumento en la cantidad de compuestos como los glucosinolatos, los cuales tienden a hidrolizarse para generar Indol-3-carbinol.

Steinbuch y col., (1979) evaluaron los cambios sensoriales con respecto a la actividad residual enzimática (peroxidasa, catalasa y lipoxigenasa) de repollitos de Bruselas almacenados congelados a -18°C ; ellos indicaron que al finalizar el almacenamiento, no se produjeron alteraciones sensoriales detectables por el panel evaluador; por el contrario si el almacenamiento se realizaba a -4 y -9°C además de existir un aumento en la actividad enzimática se generaba pérdida de atributos los cuales hacían que las muestras no sean aceptadas.

Olivera y col., (2011) evaluaron la calidad de repollitos de Bruselas pre-cocidos congelados y almacenados durante 8 meses, integrando patrones experimentales con encuestas aplicadas a consumidores frecuentes. Ellos concluyeron que diferentes métodos de tratamiento aplicados a las repollitos de Bruselas (inmersión en agua, cocción al vapor y uso de horno microondas) generan productos finales con calidad equivalente a los frescos. Según lo analizado en las encuestas, ellos observaron que los productos congelados obtuvieron niveles de calidad ligeramente más altos que otras alternativas de consumo como vegetales enlatados.

Según los resultados obtenidos se puede afirmar que los repollitos de Bruselas pre-cocidos (6 y 10 minutos), congelados y almacenados durante 4 meses a -20°C

presentaron características sensoriales similares a un vegetal fresco. La elección de los tiempos de tratamiento térmico estuvo dada por la pérdida de los otros parámetros de calidad (Color, textura y contenido de ácido ascórbico).

El consumo de repollitos de Bruselas en Argentina está especialmente dado por el producto fresco, presentando el problema de la estacionalidad ya que sólo se encuentra en la época otoño-invierno. En el mercado actual argentino no existe un producto pre-cocido congelado, a diferencia de países europeos como España o Bélgica donde es frecuente encontrar este producto en góndola a lo largo del año.

5.5. CONCLUSIONES PARCIALES

- Se determinó la variación de la actividad enzimática residual en los vegetales pre-cocidos congelados almacenados durante 4 meses; se encontró que para tiempos cortos (3 minutos) a 90°C, al final del almacenamiento congelado se presentó el fenómeno de reactivación enzimática, siendo esto más evidente para la peroxidasa que para lipoxigenasa. En estas condiciones de procesamiento al final del almacenamiento se produjo deterioro principalmente por pardeamiento en la zona apical del vegetal. Este fenómeno no se presentó en el caso de 6 y 10 minutos de tratamiento térmico.
- Se cuantificó la concentración de ácido ascórbico (AA) en repollitos de Bruselas frescos, pre-cocidos y pre-cocidos congelados. El tratamiento más conveniente fue el de 6 minutos ya que permitió mantener los niveles más altos de AA para las zona apical y externa.
- Se pudo establecer la variación del color usando el índice de pardeamiento (%IP) y ángulo hue (°h). Estos parámetros se determinaron para la zona apical y exterior indicando que para el tratamiento de 3 min se produjo reactivación enzimática y el %IP aumentó. Este fenómeno puede asociarse a la actividad enzimática de la peroxidasa.
- La evaluación del cambio de textura indicó que debido al tratamiento de pre-cocción y almacenamiento congelado se redujo la fuerza máxima produciendo ablandamiento.
- Con los resultados obtenidos se descartaron las muestras de vegetales sometidas a pre-cocción durante 3 minutos para la realización del panel sensorial. El análisis sensorial demostró que los evaluadores no encontraron

diferencias significativas entre los vegetales pre-cocidos congelados y almacenados durante 4 meses a -20°C con respecto a vegetales frescos. En la evaluación sensorial se usó satisfactoriamente la escala hedónica para evaluar los diferentes atributos, además se encontró que las puntuaciones para estos fueron en promedio puntuaciones aceptables y buenas, esto quiere decir que los productos sensorialmente cumplieron con parámetros de calidad.

- De los resultados obtenidos se puede concluir que el mejor tratamiento para aplicar en la producción de repollitos pre-cocidos congelados es de 6 minutos en inmersión en agua a 90°C . En esta condición de procesamiento no se presenta daño debido a la actividad enzimática además se mantuvo alta concentración de ácido ascórbico en las dos zonas evaluadas del vegetal.

6. CONCLUSIONES GENERALES

Partiendo de los objetivos planteados y los resultados obtenidos en cada capítulo, en esta tesis se logró desarrollar una tecnología adecuada para obtener vegetales precocidos congelados.

- Se determinaron experimentalmente las actividades enzimáticas del proceso de inactivación térmica, permitiendo obtener las curvas de inactivación enzimática en repollitos de Bruselas y brócoli para la POD y LOX. Se observó un comportamiento bifásico con presencia de dos fracciones térmicamente diferentes (fracción termo-lábil y termo-resistente). Se calculó para la POD y la LOX la energía de activación para cada tipo de isoenzima (fracción termo-lábil y termo-resistente), las fracciones iniciales de isoenzima resistente (α_R) y las constantes cinéticas de reacción del proceso de inactivación térmica (k). Estos parámetros cinéticos se obtuvieron realizando técnicas estadísticas y regresiones no lineales según el método de Arabshahi y Lund (1984) que permite una mayor precisión en los parámetros calculados. Para el caso del brócoli se compararon los resultados obtenidos con los reportados en literatura. En el caso de repollitos de Bruselas se realizó un aporte significativo debido a que hasta el momento no existía ningún trabajo publicado con parámetros cinéticos de inactivación de POD y LOX, ni estudios que indicaran existencia de isoenzimas con distinta estabilidad térmica.
- Se implementó un modelo numérico en elementos finitos que permitió simular el proceso de pre-tratamiento térmico de repollitos de Bruselas que incluye el calentamiento y enfriamiento del vegetal de geometría irregular (sólido de revolución). La simulación llevada a cabo se validó experimentalmente usando las propiedades termofísicas del vegetal y los coeficientes de transferencia calórica en interfase de los medios usados en el procesamiento. Al modelo matemático se le acoplaron las cinéticas de inactivación enzimática y las energías de activación para la POD y LOX determinadas experimentalmente, todo esto permitió calcular la concentración media de las enzimas en el producto, además de diferenciar la concentración de cada una de las fracciones

enzimáticas (temo lábil y termo resistente). El modelo de simulación numérica se validó con experimentos de calentamiento y enfriamiento de repollitos de Bruselas logrando una excelente concordancia entre temperaturas predichas y los registros experimentales. Los valores experimentales de AE tanto de POD como LOX en la zona apical del vegetal a distintos tiempos de calentamiento se contrastaron con valores predichos por el modelo de simulación mediante la integración de la AE en una región interna del dominio encontrándose un buen ajuste.

- Se corroboró la concordancia del modelo numérico implementado con ensayos los experimentales donde se varió el tiempo de pre-tratamiento térmico de los repollitos de Bruselas y se cuantificó la actividad enzimática residual para las dos enzimas estudiadas. A partir de los ensayos experimentales de calentamiento enfriamiento se lograron evaluar parámetros de calidad sensorial (variación de color y textura) y nutricional (contenido de ácido ascórbico) estableciendo cuales eran los tiempos de tratamiento que presentan cambios con respecto a un vegetal fresco.
- Se logró implementar un modelo numérico previmente desarrollado en el grupo de investigación que simula el proceso de congelación. Para tal fin fue necesario determinar el calor específico aparente utilizando Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) y los coeficientes de transferencia calórica en la interfase usando el túnel de congelación a escala piloto. Con las propiedades térmicas determinadas (C_p , k , y ρ) se logró integrar en función de la temperatura las propiedades para obtener la función Entalpía vs. Temperatura y la función de Kirchhoff vs. Temperatura. Estos resultados son importantes para realizar los cambios de variable necesarios para simular los procesos de congelación. El modelo numérico desarrollado permitió simular el proceso de congelación de los repollitos de Bruselas obteniendo un buen ajuste entre los resultados estimados numéricamente y los registrados experimentalmente. Los resultados obtenidos permiten calcular los tiempos de congelación de los vegetales, información muy útil para su procesamiento industrial.

- A partir de un ensayo de almacenamiento congelado durante 4 meses y la evaluación de la actividad enzimática en dos zonas del vegetal (apical y exterior) se pudo detectar el fenómeno de reactivación enzimática para el caso de la POD en repollitos de Bruselas pre-cocidos durante 3 minutos a 90°C. A éste fenómeno se le atribuyeron deterioros en diversos parámetros de calidad evaluados (variación color, textura y contenido de ácido ascórbico).
- Para el caso de tratamientos de a 6 y 10 minutos se pudo determinar la relación de los tratamientos térmicos (pre-cocción y almacenamiento congelado) con los atributos de calidad para las dos zonas estudiadas del vegetal, esto se acompañó con una evaluación de aceptabilidad global por medio de una prueba sensorial.
- Con todos los resultados recopilados se puede concluir que el mejor tratamiento para aplicar en la producción de repollitos pre-cocidos congelados es de 6 minutos en inmersión en agua a 90°C, a esta condición de procesamiento no se presenta daño derivado por la actividad enzimática además se mantiene buena concentración de ácido ascórbico en las dos zonas evaluadas del vegetal.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abadias, M., Usall, J., Anguera, M., Solsona, C., y Viñas, I. (2008). Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. *International Journal of Food Microbiology*, 123(1), 121–9.
- Adams, J.B. (2010). Effect of enzymatic reactions on color of fruits and vegetables. En: *Enzymes in Fruit and Vegetable Processing*, Bayindirli A. editor. Boca Raton Estados Unidos: CRC Press. p. 19-44
- Agüero, M. V., Ansorena, M. R., Roura, S. I., y del Valle, C. E. (2008). Thermal inactivation of peroxidase during blanching of butternut squash. *LWT - Food Science and Technology*, 41(3): 401–407.
- Aires A. (2015). Brassica composition and food processing. En: Victor P, editor. *Processing and impact on active components*. Londres: Elsevier Academic Press. p 17–25.
- Altunkaya, A., y Gökmen, V. (2008). Effect of various inhibitors on enzymatic browning, antioxidant activity and total phenol content of fresh lettuce (*Lactuca sativa*). *Food Chemistry*, 107(3), 1173–1179.
- Anese, M., y Sovrano, S. (2006). Kinetics of thermal inactivation of tomato lipoxygenase. *Food Chemistry*, 95(1), 131–137.
- Anthon, G. E., y Barrett, D. M. (2003). Thermal inactivation of lipoxygenase and hydroperoxytrieneic acid lyase in tomatoes. *Food Chemistry*, 81(2): 275–279.
- AOAC. (2010). *Official Methods of Analysis*. (Association of Official Analytical Chemists, Ed.) (16h ed.). Arlington.
- Arabshahi, A., y Lund, D. B. (1984). Considerations in Calculating Kinetic. *Journal Food Process Engineering*, 7(4);239-251.
- ASTM Standard E1269 - 05 “Standard Test Method for Determining Specific Heat Capacity by Differential Scanning Calorimetry”, ASTM International, West Conshohocken, PA, 2003, DOI: 10.1520/E1269-05, www.astm.org.
- Axelrod, B., Cheesbrough, T. M., y Laakso, S. (1981). Lipoxygenase from soybeans: EC 1.13. 11.12 Linoleate: oxygen oxidoreductase. *Methods in Enzymology*, 71: 441–451.
- Bahçeci, K. S., Serpen, A., Gökmen, V., y Acar, J. (2005). Study of lipoxygenase and peroxidase as indicator enzymes in green beans: 466 change of enzyme activity, ascorbic acid and chlorophylls during frozen storage. *Journal of Food Engineering*, 66:187–192.
- Barbosa-Cánovas, G. V., Altunakar, B., y Mejía-Lorío, D. J. (2005). Freezing of fruits and vegetables: An agribusiness alternative for rural and semi-rural areas (Vol. 158). Food y Agriculture Org
- Barrett, D., Garcia, E., Russell, G., Ramírez, E. y Shirazi, a. (2008). Blanch time and cultivar effects on quality of frozen and stored corn and broccoli. *Journal of Food Science*, 65: 534–540.
- Bayindirli, A. (2010). Introduction to enzymes. En A. Bayindirli editor, *Enzymes in Fruit and Vegetable Processing*. CRC Press, Raton, FL. p. 1–18.
- Begum, S., y Brewer, M. S. (1997). Microwave blanching effects on color, chemical and sensory characteristics of frozen asparagus. *Journal of Food Quality*, 20: 471-481.
- Bernhardt, S., y Schlich, E. (2006). Impact of different cooking methods on food quality: Retention of lipophilic vitamins in fresh and frozen vegetables. *Journal of Food Engineering*, 77(2), 327–333.
- Bernt, E., y Hess, B. (1965). *Methods of Enzymatic Analysis*. Ed. Bergmeyer H. U

- Elsevier. Verlag Chemie, Weinheim, Germany. Obtenido de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123956309501341>
- Bjergegaard, C., Li, P. W., Michaelsen, S., Møller, P., Otte, J., y Sørensen, H. (1994). Glucosinolates and their transformation products-compounds with a broad biological activity. *Bioactive substances in food of plant origin*, 1: 1-15.
- Bosetti, C., Filomeno, M., Riso, P., Polesel, J., Levi, F., Talamini, R., La Vecchia, C. (2012). Cruciferous vegetables and cancer risk in a network of case-control studies. *Annals of Oncology*, 23(8), 2198–2203.
- Brewer, M. S., y Begum, S. (2003). Effect of microwave power level and time on ascorbic acid content, peroxidase activity and color of selected vegetables. *Journal of Food Processing and Preservation*, 27(6): 411–426.
- Burnette, F. S. (1977). Peroxidase and its Relationship to Food Flavor and Quality: a Review. *Journal of Food Science*, 42(1), 1–6.
- Califano, A. y Zaritzky, N. (1993). A Numerical Method for Simulating Heat Transfer in Heterogeneous and Irregular Shaped Foodstuffs. *Journal of Food Process and Engineering*, 16 (3), 159-171.
- Califano, A. y Zaritzky N. (1997). Simulation of freezing or thawing heat conduction in irregular two dimensional domains by a boundary fitted grid method, *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 30(1), 70-76.
- Campas-Baypoli, O. N., Bueno-Solano, C., Martínez-Ibarra, D. M., Camacho-Gil, F., Villa-Lerma, A. G., Rodríguez-Núñez, J. R., y Sánchez-Machado, D. I. (2009). Contenido de sulforafano (1-isotiocianato-4-(metilsulfinil)-butano) en vegetales crucíferos. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 59(1), 95–100.
- Canet, W., Alvarez, M. D., Luna, P., y Fernández, C. (2004). Reprocessing effect on the quality of domestically cooked (boiled/stir-fried) frozen vegetables. *European Food Research and Technology*, 219(3), 240–250.
- Carlsaw, H. S., y Jaeger, J. C. (1959). *Heat in solids* (Vol. 1). Clarendon Press, Oxford.
- Castelfranco, P. A., y Beale, S. I. (1981). Chlorophyll biosynthesis. En *The biochemistry of plants*, Edi. Hatch, M.D. y Boardman, N.K., (Vol.8. pp 375-421). New York: Academic Press.
- Castro Montero, E., y Hombre Morgado, R.A.D. (2007). *Parámetros mecánicos y textura de los alimentos*, Universidad de Chile, Santiago. Recuperado el 20 de mayo de 2016 de <http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/121381/ParamMecTexAlim07.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Chen, G., Hackett, R., Walker, D., Taylor, A., Lin, Z., y Grierson, D. (2004). Identification of a specific isoform of tomato lipoxygenase (TomloxC) involved in the generation of fatty acid-derived flavor compounds. *Plant Physiology*, 136(1): 2641–2651.
- Cohen, J. H., Kristal, A. R., y Stanford, J. L. (2000). Fruit and vegetable intakes and prostate cancer risk. *Journal of the National Cancer Institute*, 92(1), 61–68.
- Comini, G., Del Giudice, S, y Saro, O. (1989). Conservative equivalent heat capacity methods for non-linear heat conduction. In: RW Lewis, K Morgan, Eds., *Numerical Methods in Thermal Problems*, Vol 6 Part 1. Swansea: Pineridge Press, 5-15.
- COMSOL Multiphysics (2008), *Heat Transfer Module Library*, COMSOL AB. Recuperado el 11 de septiembre de 2018 de <https://extras.csc.fi/math/comsol/3.5/doc/ht/htmodlib.pdf>
- Cumming, D. B., Stark, R., Timbers, G. E., y Cowmeadow, R. (1985). A new

- blanching system for the food industry. II. Commercial design and testing. *Journal of Food Processing and Preservation*, 8(3-4), 137–150.
- Czarniecka-Skubina, E. (2002). Effect of the material form, storage and cooking methods on the quality of brussels sprouts. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 11/52.
- Danesi, F., y Bordoni, A. (2008). Effect of Home Freezing and Italian Style of Cooking on Antioxidant Activity of Edible Vegetables. *Journal of Food Science*, 73(6), H109–H112.
- Delgado, A.E, y Sun,D.W. (2000). Heat and mass transfer for predicting freezing processes, a review. *Journal of Food Engineering*. 47:157-174.
- DeMan, J, M., (1999), *Principles of Food Chemistry*, (3ed. pp.304). Maryland: Aspen Publication.
- Earl, R. L., (1988). *Ingeniería de los Alimentos*. (2^{da} Ed.) Ed. Acribia, Zaragoza, España.
- Erdogdu, F. (2005). Mathematical approaches for use of analytical solutions in experimental determination of heat and mass transfer parameters. *Journal of Food Engineering*, 68(2), 233-238.
- Fahey, J. W., Zalcmann,T., y Talalay, P. (2001). The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry*, 56(1), 5–51.
- FAO. (2003). Fomento del consumo mundial de frutas y verduras. Obtenido el 1 de Junio, 2015, de <http://www.who.int/dietphysicalactivity/fruit/es/index1.html>
- FAOSTAT. (2014). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Dirección de Estadística. Obtenido el 29 junio, 2017, de <http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/S>
- Fennema O. R., Powrie, W. D., y Marth, E. H. (1973). *Low Temperatures Preservation of Foods and Living Matter*. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Fikiin, K. A. (1996). Generalized numerical modeling of unsteady heat transfer during cooling and freezing using an improved enthalpy method and quasi–one–dimensional formulation. *Intl.J. Refrigeration* 19(2): 132–140.
- Fikiin, K. A. (1998). Some general principles in modeling of unsteady heat transfer in two–phase multi–component aqueous food systems for product quality improvement. In *Food Quality Modelling*, B. M. Nicolai and J. De Baerdemaeker, eds., 179–186. Luxembourg
- Frozen Food Fundation. (2016). The Proud Heritage of Frozen Foods. Recuperado 19 de junio de 2016 de <http://www.frozenfoodfacts.org/about-frozen-foods/story-frozen-foods>
- Galliard, T., y Chan, H. (1980). Lipoxygenases" en "The Biochemistry of Plants (Vol. 4). (P. Stumpf, Ed.) New York.: Academic Press Inc.
- Galliard, T., y Phillips, D. R. (1971). Lipoxygenase from potato tubers. Partial purification and properties of an enzyme that specifically oxygenates the 9-position of linoleic acid. *Biochemical Journal*, 124(2): 431–438.
- Gardner, H. W. (1991). Recent investigations into the lipoxygenase pathway of plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 1084(3): 221-239.
- Garrote, R. L., Silva, E. R., y Bertone, R. A. (2001). Kinetic parameters for thermal inactivation of cut green beans lipoxygenase calculated using unsteady-state methods. *International journal of food science y technology*, 36(4), 377-385.
- Giannakourou, M. C., y Taoukis, P. S. (2003). Kinetic modelling of vitamin C loss in frozen green vegetables under variable storage conditions. *Food chemistry*, 83:

33-41

- Gökmen, V. (2010). Selection of the Indicator Enzyme for Blanching of Vegetables. En: *Enzymes in Fruit and Vegetable Processing*, Bayindirli A. editor. Boca Ranton Estados Unidos: CRC Press. p. 123–144.
- Gómez-Campo, C., y Prakash, S. (1999). Biology of Brassica Coenospecies. En *Developments in Plant Genetics and Breeding* (Vol. 4). Amsterdam: Elsevier. p. 33–58.
- Gonçalves, E. M., Abreu, M., Brandao, T. R., y Silva, C. L. (2011). Degradation kinetics of colour, vitamin C and drip loss in frozen broccoli (*Brassica oleracea* L. ssp. *Italica*) during storage at isothermal and non-isothermal conditions. *International Journal of Refrigeration*, 34: 2136-2144.
- Gonçalves, E. M., Pinheiro, J., Alegria, C., Abreu, M., Brandão, T. R. S., y Silva, C. L. M. (2009). Degradation kinetics of peroxidase enzyme, phenolic content, and physical and sensorial characteristics in broccoli (*Brassica oleracea* L. ssp. *Italica*) during blanching. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(12), 5370–5375.
- Gonçalves, E. M., Pinheiro, J., Alegria, C., Abreu, M., Brandão, T. R. S., y Silva, C. L. M. (2009). Degradation kinetics of peroxidase enzyme, phenolic content, and physical and sensorial characteristics in broccoli (*Brassica oleracea* L. ssp. *Italica*) during blanching. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 5370–5375.
- González-Hidalgo, I., Moreno, D. A., García-Viguera, C., y Ros-García, J. M. (2018). Effect of industrial freezing on the physical and nutritional quality traits in broccoli. *Food Science and Technology International*, 1082013218795807.
- Greve, L. C., Shackel, K. A., Ahmadi, H., McArdle, R. N., Gohlke, J. R., y Labavitch, J. M. (1994). Impact of heating on carrot firmness: contribution of cellular turgor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(12), 2896-2899.
- Guerrero, S., Alzamora, S. M., y Gerschenson, L. N. (1996). Optimization of a combined factors technology for preserving banana puree to minimize colour changes using response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 28: 307–322.
- Güneş, B., y Bayindirli, A. (1993a). Peroxidase and lipoxygenase inactivation during blanching of green beans, green peas and carrots. *LWT-Food Science and Technology*, 26(5): 406–410.
- Halkier, B.A., y Gershenzon, J. (2006). Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57, 303-333.
- Hansen, M., Laustsen, A. M., Olsen, C. E., Poll, L., y Sørensen, H. (1997). Chemical and sensory quality of broccoli (*Brassica oleracea* L. var *italica*). *Journal of Food Quality*, 20: 441-459.
- Henriksen, A., Mirza, O., Indiani, C., Teilum, K., Smulevich, G., Welinder, K. G., y Gajhede, M. (2001). Structure of soybean seed coat peroxidase: A plant peroxidase with unusual stability and haem-apoprotein interactions. *Protein Science*, 10(1), 108-115.
- Hernández, Y., Lobo, M. G., y González, M. (2006). Determination of vitamin C in tropical fruits: A comparative evaluation of methods. *Food chemistry*, 96: 654-664.
- Holdsworth, S. D. (1985). Optimisation of thermal processing—a review. *Journal of Food Engineering*, 4(2):89–116.
- Jaiswal, A. K., Gupta, S., y Abu-Ghannam, N. (2012). Kinetic evaluation of colour, texture, polyphenols and antioxidant capacity of Irish York cabbage after

- blanching treatment. *Food Chemistry*, 131: 63–72.
- Jalaei, F., Fazeli, A., Fatemian, H., y Tavakolipour, H. (2011). Mass transfer coefficient and the characteristics of coated apples in osmotic dehydrating. *Food and Bioproducts Processing*, 89: 367–374.
- Kafkas, E., Koşar, M., Türemiş, N., y Başer, K. H. C. (2006). Analysis of sugars, organic acids and vitamin C contents of blackberry genotypes from Turkey. *Food Chemistry*, 97(4), 732–736.
- Kidmose, U., Edelenbos, M., Nørbæk, R., Christensen, L. P., y MacDougall, D. B. (2002). Colour stability in vegetables. En *Colour in Food: Improving Quality*, CRC Press, p. 179–232.
- Kidmose, U., y Martens, H. J. (1999). Changes in texture, microstructure and nutritional quality of carrot slices during blanching and freezing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79: 1747–1753.
- Kim, M. K., y Park, J. H. Y. (2009). Conference on “Multidisciplinary approaches to nutritional problems”. Symposium on “Nutrition and health”. Cruciferous vegetable intake and the risk of human cancer: epidemiological evidence. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 68(1), 103–110.
- Krarup, C., y Moreira, I. (1998). Hortalizas de estación fría. *Biología y diversidad cultural*. Obtenido el 3 mayo de, 2016, de http://www7.uc.cl/sw_educ/hort0498/index.html
- Kuroiwa, Y., Nishikawa, A., Kitamura, Y., Kanki, K., Ishii, Y., Umemura, T., y Hirose, M. (2006). Protective effects of benzyl isothiocyanate and sulforaphane but not resveratrol against initiation of pancreatic carcinogenesis in hamsters. *Cancer Letters*, 241(1): 275–280.
- Kushad, M. M., Guidera, M., y Bratsch, A. D. (1999). Distribution of horseradish peroxidase activity in horseradish plants. *HortScience*, 34: 127–129.
- Lagrimini, L. M., Vaughn, J., Erb, W.A, y Miller, S. a. (1993). Peroxidase Overproduction in Tomato - Wound-Induced Polyphenol Deposition and Disease Resistance. *Hortscience*, 28(3), 218–221.
- Lau, M. H., Tang, J., y Swanson, B. G. (2000). Kinetics of textural and color changes in green asparagus during thermal treatments. *Journal of Food Engineering*, 45: 231–236.
- Lawless, H. T., y Heymann, H. (2010). Acceptance Testing. En *Sensory evaluation of food: principles and practices* (2nd ed., pp. 325–336). London: Springer Science y Business Media.
- Lewis, M.J. (1993), *Propiedades físicas de los alimentos y de los sistemas de Procesado*, Acribia, 135-167.
- Lin, L., Lei, F., Sun, D. W., Dong, Y., Yang, B., y Zhao, M. (2012). Thermal inactivation kinetics of *Rabdosia serra* (Maxim.) Hara leaf peroxidase and polyphenol oxidase and comparative evaluation of drying methods on leaf phenolic profile and bioactivities. *Food Chemistry*, 134(4), 2021–2029.
- Linares, H. (2011). *Dinámica Comercial de la Col de Bruselas*. Ficha 37/ UE Programa de Desarrollo Económico Sostenible En Centro América. Obtenido de <http://www.resultados1.com/caja-ue/images/stories/fichas/guatemala/gt-col-de-bruselas.pdf>
- Ling, A., y Lund, D., (1978). Determining kinetic parameters for thermal inactivation of heat-resistant and heat-labile isozymes from thermal destruction curves. *Journal of Food Science*, 43(4), 1307–1310.
- Lisiewska, Z., y Kmiecik, W. (1996). Effects of level of nitrogen fertilizer, processing conditions and period of storage of frozen broccoli and cauliflower on vitamin C

- retention. *Food Chemistry*, 57: 267-270.
- MacKinney, G., y Weast, C. A. (1940). Colors changes in green vegetables; frozen-pack peas and string beans. *Industrial and Engineering Chemistry*, 32: 392–395
- Maffei, D. F., Alvarenga, V. O., Sant'Ana, A. S., y Franco, B. D. G. M. (2016). Assessing the effect of washing practices employed in Brazilian processing plants on the quality of ready-to-eat vegetables. *LWT - Food Science and Technology*, 69, 474–481.
- Mallett, C.P. (1993). *Frozen Food Technology*. Chapman and Hall, London, UK.
- Martin, C. (2013). The interface between plant metabolic engineering and human health. *Current Opinion in Biotechnology*, 24: 344–353.
- Martins, R.C. (2006). Simple finite volumes and finite elements procedures for food quality and safety simulations. *Journal of Food Engineering*, 73(4), 327 - 338.
- Matusheski, N. V., Juvik, J. A., y Jeffery, E. H. (2004). Heating decreases epithiospecifier protein activity and increases sulforaphane formation in broccoli. *Phytochemistry*, 65(9), 1273-1281.
- Mazzeo, T., N'Dri, D., Chiavaro, E., Visconti, A., Fogliano, V., y Pellegrini, N (2011). Effect of two cooking procedures on phytochemical compounds, total antioxidant capacity and colour of selected frozen vegetables. *Food Chemistry*, 128: 627–633.
- Mazzeo, T., Nyapos; Dri, D., Chiavaro, E., Visconti, A., Fogliano, V., y Pellegrini, N. (2011). Effect of two cooking procedures on phytochemical compounds, total antioxidant capacity and colour of selected frozen vegetables. *Food Chemistry*, 128(3), 627–633.
- Mazzeo, T., Paciulli, M., Chiavaro, E., Visconti, A., Fogliano, V., Ganino, T., y Pellegrini, N. (2015). Impact of the industrial freezing process on selected vegetables-Part II. Colour and bioactive compounds. *Food Research International*, 75: 89-97.
- McNaughton J.L. y Mortimer C.T. (1975) *Calorimetría Diferencial de Barrido*. Perkin Elmer Corporation, Connecticut, USA.
- Morales-Blancas, E., Chandia, V. E., y Cisneros-Zevallos, L. (2002). Thermal inactivation kinetics of peroxidase and lipoxygenase from broccoli, green asparagus and carrots. *Journal of Food Science*, 67(1), 146–154.
- Müftügil, N. (1985). The peroxidase enzyme activity of some vegetables and its resistance to heat. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 36(9), 877–880.
- Murcia, M. A., López-Ayerra, B., Martínez-Tomé, M., Vera, A. M., y García-Carmona, F. (2000). Evolution of ascorbic acid and peroxidase during industrial processing of broccoli. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80:1882-1886.
- Nagodawithana, T., y Reed, G. (1993). *Enzymes in food processing*, 3 ed., Academic Press Inc., p. 279-291
- Nelson, D. L., Osgood, M., Cox, M. M., y Ocorr, K. (2004). Enzimas: Cinética e inhibición. In Macmillan Higher Education (Ed.), *Lehninger Principles of Biochemistry* (4th ed., pp. 189–217). Obtenido de <https://books.google.com.ar/books?id=ffbEAAAACAAJ>
- Nesvadba P., (2008). Thermal Properties and Ice Crystal Development in Frozen Foods. In J. Evans, *Frozen Food Science and Technology* (pp.1-25). Oxford, UK: Blackwell Publishing.
- Neves, V. A., y Lourenço, E. J. (1998). Peroxidase from Peach Fruit : Thermal Stability. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 41(2).

- Nguyen, L. T., Tay, A., Balasubramaniam, V. M., Legan, J. D., Turek, E. J., y Gupta, R. (2010). Evaluating the impact of thermal and pressure treatment in preserving textural quality of selected foods. *LWT- Food Science and Technology*, 43, 525–534.
- Nováková, L., Solich, P., y Solichová, D. (2008). HPLC methods for simultaneous determination of ascorbic and dehydroascorbic acids. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 27: 942-958.
- Olivera, D. F., Vina, S. Z., Marani, C. M., Ferreyra, R. M., Mugridge, A., Chaves, A. R., y Mascheroni, R. H. (2008). Effect of blanching on the quality of Brussels sprouts (*Brassica oleracea* L. gemmifera DC) after frozen storage. *Journal of Food Engineering*, 84:148-155.
- Olivera, D. F., Vina, S. Z., Marani, C. M., Ferreyra, R. M., Mugridge, A., Chaves, A. R., y Mascheroni, R. H.. (2011). Integration of an Objective Approach Focused on the Consumer to Evaluate the Quality of Processed Brussels Sprouts. *Food and Nutrition Sciences*, 2:1011:1017.
- Olivera, D. F., Vina, S. Z., Marani, C. M., Ferreyra, R. M., Mugridge, A., Chaves, A. R., y Mascheroni, R. H. (2008). Effect of blanching on the quality of Brussels sprouts (*Brassica oleracea* L. gemmifera DC) after frozen storage. *Journal of Food Engineering*, 84:148-155.
- OMS (2005). Fruit and vegetables for health. Reporte FAO/WHO Workshop on Fruit and Vegetables for Health (2004, Kobe, Japan).
- Orzolek, M., y Lamont Jr, W. (2012). Broccoli production. Obtenido 3 de Mayo, 2016, de <http://extension.psu.edu/business/ag-alternatives/horticulture/vegetables/broccoli-production>
- Oszmianski, J., y Lee, C. Y. (1990). Inhibitory effect of phenolics on carotene bleaching in vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(3): 688–690.
- Paciulli, M., Ganino, T., Pellegrini, N., Rinaldi, M., Zaupa, M., Fabbri, A., y Chiavaro, E. (2015). Impact of the industrial freezing process on selected vegetables—part I. Structure, texture and antioxidant capacity. *Food Research International*, 74, 329-337.
- Pan, Z., Singh R. P., y Rumsey T. R. (2000). Predictive modeling of contact-heating process for cooking a hamburger patty. *Journal of Food Engineering* 46, 9-19.
- Patras, A., Tiwari, B. K., y Brunton, N. P. (2011). Influence of blanching and low temperature preservation strategies on antioxidant activity and phytochemical content of carrots, green beans and broccoli. *LWT-Food Science and Technology*, 44(1), 299-306.
- Pérez, C., Barrientos, H., Román, J., y Mahn, A. (2014). Optimization of a blanching step to maximize sulforaphane synthesis in broccoli florets. *Food chemistry*, 145, 264-271.
- Peryam, D, R., and Girardot, N, F., 1952, Advanced taste test method, *Food Engineering*, 24: 58–61, 194.
- Pham, Q.T, (2006). Mathematical modeling of freezing processes. In Da-Wen Sun, *Handbook of frozen food processing and packaging*. New York: Taylor y Francis Group. p.141-173
- Pham, Q.T, (2008). Modelling of Freezing Processes. In J. Evans, *Frozen Food Science and Technology* Oxford, UK: Blackwell Publishing.p.51-80.
- Pham, Q.T., 2012. Mathematical modeling of freezing processes. In: Sun, D.W. (Ed.), *Handbook of Frozen Food Processing and Packaging*. , 2nd ed. CRC/Taylor and Francis Group, BocaRaton/London/New York, pp. 147–186 (Chapter 7).

- Pinsky, A., Grossman, S., y Trop, M. (1971). Lipoxygenase content and antioxidant activity of some fruits and vegetables. *Journal of Food Science*, 36(4), 571–572.
- Podsedeck, A. (2007). Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT - Food Science and Technology*, 40(1), 1–11.
- Polata, H., Wilińska, A., Bryjak, J., y Polakovič, M. (2009). Thermal inactivation kinetics of vegetable peroxidases. *Journal of Food Engineering*, 91(3): 387–391.
- Ponting, J. D., y Joslyn, M. A. (1948). Ascorbic acid oxidation and browning in apple tissue extracts. *Arch. Biochem.*, 19, 47–63.
- Poulsen, K. P. (1986). Optimization of vegetable blanching. *Food Technology (USA)*, 40, 122-129.
- Rabellato, L., Del Giudice, S. y Comini, G., (1978). Finite element analysis of freezing process in foodstuffs. *Journal of Food Science* 43, 239-250
- Ramaswamy, H. S., y Chen, C. R. (2002). Maximising the quality of thermally processed fruits and vegetables. En: Jongen W, editor. *Fruit and vegetable processing: improving quality*, CRC Press, New York. p. 188-214.
- Riso, P., Del Bo', C., y Vendrame, S. (2014). Preventive Effects of Broccoli Bioactives: Role on Oxidative Stress and Cancer Risk. *Cancer: Oxidative Stress and Dietary Antioxidants*. Elsevier. Obtenido de <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-405205-5.00011-8>
- Russell, L. F. (2000). Quantitative determination of water-soluble vitamins. *Food Science And Technology-New York-Marcel Dekker-*, 403-476.
- Sá M. M., Figueiredo A. M., Correa A., y Sereno A. M., (1994) Apparent heat capacities, initial melting points and heats of melting of frozen fruits measured by differential scanning calorimetry. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 34 (2), 202-209.
- Sainz, A. (2017). Alimentos congelados: el mercado comienza a entrar en calor. Artículo publicado el 22 de marzo de 2017 por La Nación. Recuperado 9 de julio de 2017 de <http://www.lanacion.com.ar/1996847-alimentos-congelados-el-mercado-comienza-a-entrar-en-calor>
- Santos, M. V. (2010). Simulación numérica de problemas de transferencia de energía en alimentos de geometría irregular utilizando el método de los elementos finitos. Tesis Doctoral de la Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de La Plata. <https://digital.cic.gba.gob.ar/handle/11746/2117>
- Sanz, L. C., Pérez, A. G., y Olías, J. M. (1992). Lipoxygenase in the plant kingdom. I. Properties. *Grasas y Aceites*, 43(4), 231–239.
- Saraiva, J., Oliveira, J. C., Lemos, A., y Hendrickx, M. (1996). Analysis of the kinetic patterns of horseradish peroxidase thermal inactivation in sodium phosphate. *International Journal of Food Science and Technology*, 3(2): 223–231.
- Sarikaya, A., y Ozilgen, M. (1991). Kinetics of peroxidase inactivation during thermal processing of whole potatoes. *Lebensm-Wiss u-Technologie*, 24(2), 159-163.
- Schebor, C., Buera, P., Karel, M., Chirife, J. (1999). Color formation due to non-enzymatic browning in amorphous, glassy, anhydrous, model systems. *Food Chemistry*, 65: 427–432.
- Scheerlinck N., Verboven P., Fikiin K. A., De Baerdemaeker J. y Nicolaï B M. (2001). Finite element computation of unsteady phase change heat transfer during freezing or thawing of food using a combined enthalpy and Kirchhoff transform method. *Transactions of the ASAE*: 44(2), 429–438.
- Schwimmer, S. (1981). *Source book of food enzymology*. Westport, Conn: AVI Pub. Co.

- Seasolve-Software (2003), Peakfit v4, 12, 00.
- Sheu, S. C., y Chen, A. O. (1991). Lipoxxygenase as blanching index for frozen vegetable soybeans. *Journal of food science*, 56: 448-451.
- Singh, J., Upadhyay, a. K., Prasad, K., Bahadur, A., y Rai, M. (2007). Variability of carotenes, vitamin C, E and phenolics in Brassica vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(2), 106–112.
- Skrzypczak-Jankun, E., Borbulevych, O. Y., Zavodszky, M. I., Baranski, M. R., Padmanabhan, K., Petricek, V., y Jankun, J. (2006). Effect of crystal freezing and small-molecule binding on internal cavity size in a large protein: X-ray and docking studies of lipoxxygenase at ambient and low temperature at 2.0 Å resolution. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 62(7), 766-775.
- Soysal, Ç. y Söylemez, Z. (2005). Kinetics and inactivation of carrot peroxidase by heat treatment. *Journal of Food Engineering*, 68(2): 349–356.
- Spínola, V., Llorent-Martínez, E. J., y Castilho, P. C. (2014). Determination of vitamin C in foods: Current state of method validation. *Journal of Chromatography A*, 1369: 2-17.
- Steinbuch, E., Hilhorst, R. A., Klop, W., Robbers, J. E., Rol, W., y Van Der Vuurst De Vries, R. G. (1979). Quality changes in frozen Brussels sprouts during storage. I. Sensory characteristics and residual enzyme activities. *International Journal of Food Science y Technology*, 14: 289-299.
- Surrey, K. (1964). Spectrophotometric method for determination of lipoxidase activity. *Plant Physiology*, 39(1): 65.
- Szczesniak, A.S., (2002). Texture is a sensory property, *Food quality and preference*, 13:215-225.
- Szymanowska, U., Jakubczyk, A., Baraniak, B., y Kur, A. (2009). Characterisation of lipoxxygenase from pea seeds (*Pisum sativum* var. Telephone L.). *Food Chemistry*, 116(4): 906–910.
- Tapadia, S. B., Arya, A. B., y Devi, P. R. (1995). Vitamin C contents of processed vegetables. *Journal of Food Science and Technology-Mysore*, 32: 513-515.
- Thongsook, T., y Barrett, D. M. (2005). Heat inactivation and reactivation of broccoli peroxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(8), 3215–3222.
- Tijsskens, L. M. M., Schijvens, E. P. H. M., y Biekman, E. S. A. (2001). Modelling the change in colour of broccoli and green beans during blanching. *Innovative Food Science y Emerging Technologies*, 2: 303–313.
- Torregrosa Verdú, F. (2006). Determinación de Vitamina C y Carotenoides en Zumos de Frutas y Hortalizas Frescos, Tratados por Calor o por Pulsos Eléctricos de Alta Intensidad (PEAI). (Tesis doctoral). Universidad de Valencia. Valencia, España.
- Trinder, N. (1966). The use of diphenylcarbazone for the determination of microgram amounts of lead. *Analyst*, 91(1086): 587–590.
- Tudoran, A., Olsen, S. O., y Dopico, D. C. (2009). The effect of health benefit information on consumers health value, attitudes and intentions. *Appetite*, 52: 568-579.
- Turkmen, N., Poyrazoglu, E. S., Sari, F., y Velioglu, Y. S. (2006). Effects of cooking methods on chlorophylls, pheophytins and color of selected green vegetables. *International Journal of Food Science Technology*, 41: 281–288.
- USDA. (2015). National nutrient database for standard reference release 27. Recuperado agosto 20, 2015, de <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods>
- Vámos-Vigyázó, L., y Haard, N. F. (1981). Polyphenol oxidases and peroxidases in

- fruits and vegetables. *Critical Reviews in Food Science y Nutrition*, 15(1): 49–127.
- Vargas, A, Pérez, J, Zoffoli, J, P.y Pérez, A, (2000), Evolución de la textura de bayas de uva del cv, Thompson Seedless, *Ciencia e Investigación Agraria*, 27(2), 117–126,
- Velasco, P. J., Lim, M. H., Pangborn, R. M., y Whitaker, J. R. (1989). Enzymes Responsible for Off-Flavor and Off-Aroma in Blanched and Frozen-Stored Vegetables-1. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 11(1), 118–127.
- Vernooy-Gerritsen, M., Bos, L., Veldink, G. a, y Vliegenthart, J. F. (1983). Localization of lipoxygenases 1 and 2 in germinating soybean seeds by an indirect immunofluorescence technique. *Plant Physiology*, 73(2): 262–267.
- Vernooy-Gerritsen, M., Bosa L., Veldink, G. a, y Vliegenthart, J. F. (1983). Localization of lipoxygenases 1 and 2 in germinating soybean seeds by an indirect immunofluorescence technique. *Plant Physiology*, 73(2), 262–267.
- Viña, S. Z., Olivera, D. F., Marani, C. M., Ferreyra, R. M., Mugridge, A., Chaves, A. R., y Mascheroni, R. H. (2007). Quality of Brussels sprouts (*Brassica oleracea* L. gemmifera DC) as affected by blanching method. *Journal of Food Engineering*, 80: 218–225.
- Viteri, L., (2003). “Hortalizas Congeladas, “(Doc A-14) Estudio 1 EG 33.7, Componente A; BID 925/OC-AR. CEPAL Office-UN en Buenos Aires Economica Police Office, Ministerio Nacional de Economia-Argentina. Recuperado el 20 junio de 2016 de <http://www.eclac.org/argentina/noticias/paginas/7/12267/Informe33714A.PDF>
- Voet, D., y Voet, J. G. (2006). Mecanismo de acción de las enzimas. In *Bioquímica* (3rd ed., pp. 473–546). Buenos Aires: Ed. Médica Panamericana.
- Watanabe, L., de Moura, P. R., Bleicher, L., Nascimento, A. S., Zamorano, L. S., Calvete, J.J., y Shnyrov, V. L. (2010). Crystal structure and statistical coupling analysis of highly glycosylated peroxidase from royal palm tree (*Roystonea regia*). *Journal of structural biology*, 169(2), 226–242.
- Wawire, M., Oey, I., Mathooko, F. M., Njoroge, C. K., Shitanda, D., y Hendrickx, M. (2016). Kinetics of thermal inactivation of peroxidase and color degradation of African cowpea (*Vigna unguiculata*) leaves. *Journal of food science*, 81(1).
- Weast, R. C., y Astle, M.J., (1981). *Handbook of chemistry and physics*. 63 Ed. Boca Raton, Florida: CRC press.
- Williams, D. C., Lim, M. H., Chen, A. O., Pangborn, R. M., y Whitaker, J. R. (1986). Blanching of Vegetables for Freezing - Which Indicator Enzyme to Choose. *Food Technol*, 40, 130–140.
- Yamamoto, H. Y., Steinberg, M., y Nelson, A. I. (1961). Kinetic studies on the heat inactivation of peroxidase in sweet corn. *Journal of Food Science*, 27(2): 113–119.
- Yemenicioğlu, A., Özkan, M., y Cemeroğlu, B. (1998). Thermal Stabilities of Peroxidases from Fresh Pinto Beans. *Journal of Food Science*, 63(6), 987–990.
- Zapata, L.M., Malleret, A.D., Quinteros, C.F., Lesa, C.E., Vuarant, C.O., Rivadeneira, M.F., y Gerard, J.A. (2010). Estudio sobre cambios de la firmeza de bayas de arándanos durante su maduración, *Ciencia, docencia y tecnología*, 41:159–171.
- Zhang, D., y Hamauzu, Y. (2004). Phenolics, ascorbic acid, carotenoids and antioxidant activity of broccoli and their changes during conventional and microwave cooking. *Food Chemistry*, 88(4), 503–509.
- Zienkiewicz, O.C., y Taylor, R.L. (1994). *El método de los elementos finitos*, volumen I. McGraw-Hill, Barcelona.

Anexo I

POSTROCESAMIENTO ACOPLE INACTIVACION ENZIMATICA POD Y LOX

```
clc,clear
```

```
S = xlsread('salidaexp7')
```

S=

tiempo	Temperatura
0	25.67303
2	25.75695
4	25.7727
6	25.84606
8	25.99545
10	26.24343
12	26.58816
14	26.97775
16	27.42867
18	27.94656
20	28.51705
22	29.08758
24	29.6581
26	30.27853
28	30.9088
30	31.53912
32	32.172
34	32.82592
36	33.47985
38	34.1338
40	34.78307
42	35.4249
44	36.06667
46	36.7085
48	37.35027
50	37.9921
52	38.63387
54	39.2757

.....

%salida experimental exp 7 contiene la Temperatura media del vegetal en la zona apical. Zona apical se simulo con un subdominio circular de radio 1.33cm

S es un vector de Temperatura media en función del tiempo (intervalo cada 2 s)

Enzima POD

CoPOD=457

Colabil=(1-0.25019)*CoPOD

klabil=4.24E-2

Ealabil=6.25E4

Enzima LOX
CoLOX=44.9
ColabilLOX=(1-0.3097)*CoLOX
klabilLOX=2.05E-2
EalabilLOX=6.58E4

Rg=8.31439
Tref=80

Integral numerica en el tiempo para POD labil

```
n=1
suma=0 ;
Cl(1,n)=Colabil;
for k=1:length(S(:,1))-1
    A1=exp(-Ealabil*(1/Rg)*((1/(S(k+1,2)+273.15))-(1/(Tref+273.15))));
    A2=exp(-Ealabil*(1/Rg)*((1/(S(k,2)+273.15))-(1/(Tref+273.15))));
    suma=suma+(A1+A2)*0.5*2;
    Cl(k+1,n)=Colabil*exp(-klabil*suma);
end
```

Integral numerica en el tiempo para LOX labil

```
n=1
suma=0 ;
ClLOX(1,n)=ColabilLOX;
for k=1:length(S(:,1))-1
    A1=exp(-EalabilLOX*(1/Rg)*((1/(S(k+1,2)+273.15))-(1/(Tref+273.15))));
    A2=exp(-EalabilLOX*(1/Rg)*((1/(S(k,2)+273.15))-(1/(Tref+273.15))));
    suma=suma+(A1+A2)*0.5*2;

    ClLOX(k+1,n)=ColabilLOX*exp(-klabilLOX*suma);

end
```

Coresistant=0.25019*CoPOD
kresistant=5.37E-3
Earesistant=5.63E4

CoresistantLOX=0.3097*CoLOX
kresistantLOX=1.61E-3
EaresistantLOX=6.37E4

Rg=8.31439
Tref=80

Integral numerica en el tiempo para POD resistente

```

n=1
suma=0 ;
Cr(1,n)=Coresistant;
for k=1:length(S(:,1))-1
    A1=exp(-Earesistant*(1/Rg)*((1/(S(k+1,2)+273.15))-(1/(Tref+273.15))));
    A2=exp(-Earesistant*(1/Rg)*((1/(S(k,2)+273.15))-(1/(Tref+273.15))));
    suma=suma+(A1+A2)*0.5*2;

    Cr(k+1,n)=Coresistant*exp(-kresistant*suma);

```

```
end
```

```

n=1
suma=0 ;
CrLOX(1,n)=CoresistantLOX;

```

Integral numerica en el tiempo para LOX resistente

```

for k=1:length(S(:,1))-1
    A1=exp(-EaresistantLOX*(1/Rg)*((1/(S(k+1,2)+273.15))-(1/(Tref+273.15))));
    A2=exp(-EaresistantLOX*(1/Rg)*((1/(S(k,2)+273.15))-(1/(Tref+273.15))));
    suma=suma+(A1+A2)*0.5*2;

    CrLOX(k+1,n)=CoresistantLOX*exp(-kresistantLOX*suma);

```

```
end
```

```
tciclo=S(:,1)/60
```

```

CPODTOT=CI+Cr;
CLOXTOT=CILOX+CrLOX;

```

```

CrPOD=Cr
CIPOD=CI

```

```

%plot(tciclo, CrPOD, tciclo, CIPOD, tciclo, CPODTOT), legend('CrPOD','CIPOD', 'CmPOD')
plot(tciclo, 100*CrLOX/CoLOX, tciclo, 100*CILOX/CoLOX, tciclo, 100*CLOXTOT/CoLOX),
legend('CrLOX','CILOX', 'CmLOX')

```

```

plot(tciclo, 100*CrPOD/CoPOD, tciclo, 100*CIPOD/CoPOD, tciclo, 100*CPODTOT/CoPOD),
legend('CrLOX','CILOX', 'CmLOX')
plotyy(tciclo,100*CLOXTOT/CoLOX, tciclo, S(:,2));

```

```
CPODMatriz=[tciclo 100*CPODTOT/CoPOD S(:,2)]
```

```
plotyy(tciclo,100*CPODTOT/CoPOD, tciclo, S(:,2));
```

Anexo II

CODIGO COMPUTACIONAL REALIZADO CON ENTALPIA Y KIRCHHOFF

```
%Ecuacion de Calor 2Drev con flujo de calor en el borde repollitos de
%brusela
clear all,clc
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

%%Se añade la información de la malla%%%
load mallarepollo2.mat; Mallado exportado desde COMSOL
load VectoresRepollitos;Estos vectores son E, H y T.
%matriz de coordenadas de
nodos%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
coordenadas=grilla';
%%numero de nodos totales
nodos_t=length(grilla);
%numero de elementos
n_elem=length(nodes);
%numero de nodos por elemento
nn_elem=3;
gr_l=1;
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

%%Inicializacion de
variables%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
Volumen=0;
AreaAnalitica=0;
AreaNumericaTot=0;
KG=sparse(zeros(nodos_t));
KQtot=sparse(zeros(nodos_t));
CG=sparse(zeros(nodos_t));
FG=sparse(zeros(nodos_t,1));
T=ones(nodos_t,1);
%%%%%%%%Temperatura inicial%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
Ti=18.5;
T=Ti*T;
%%%%%%%%Temperatura Externa%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
Tf=-25;
Telem=Ti;

Aquí se incorpora información de propiedades termofisicas transformadas en
función de Kirchhoff y Entalpia vs. Temperatura.
EK=interpl(Trango,Ekirch,Telem);Kirchhoff
LK=interpl(Trango,Lkirch,Telem);Entalpia
E=ones(nodos_t,1)*EK;
L=ones(nodos_t,1)*LK;
%%%%%%%%Coeficiente de transferencia de calor%%%%%%%%
%para repollito1
h=19.5;
%%%%%%%%Puntos de Integracion gaussiana%%%%%%%%%%%%%%%%
```

```

pp=3;
%%estos son los puntos de integracion para el triángulo
if pp==3
    r1=[15/90 6/9 15/90];
    s1=[15/90 15/90 6/9];
    p1=[1/3 1/3 1/3];
end
%%esto son los puntos de integracion para el borde curvilíneo
pc=3;
if pc==3
    rg=[-sqrt(3/5),0.,sqrt(3/5)];
    p=[5./9.,8./9.,5./9.];
end
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%

%%comienza el loop por
elemento%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
for n=1:n_elem;

    %inicializacion de la matriz KE y CE
    KE=zeros(gr_l*nn_elem);
    CE=zeros(gr_l*nn_elem);

    %tomo las coordenadas del elemento correspondiente
    x1=coordenadas(1,nodes(1,n));
    x2=coordenadas(1,nodes(2,n));
    x3=coordenadas(1,nodes(3,n));

    y1=coordenadas(2,nodes(1,n));
    y2=coordenadas(2,nodes(2,n));
    y3=coordenadas(2,nodes(3,n));

    X=[x1 x2 x3 ;y1 y2 y3 ]';

    %%aca hago la integracion de gauss para 2D dos loops
    for i=1:pp

        h1=1-r1(i)-s1(i);
        h2=r1(i);
        h3=s1(i);

        H=[h1,h2,h3] ;

        h1r=-1;
        h2r=1;
        h3r=0;
        h1s=-1;
        h2s=0;
        h3s=1;

        Hr=[h1r,h2r,h3r;h1s,h2s,h3s];
        %%%Jacobiano%%%
        J=Hr*X;
        dete=abs(det(J));
        %%%inversa del Jacobiano

```

```

Ji=inv(J);

BE=Ji*Hr;
w=p1(i);

%Hlumped=[h1 0 0;0 h2 0;0 0 h3];
xx=H*X(:,1);

%uso un 0.5 porque uso puntos de integracion con triangulos
KE=KE+0.5*dete*w*BE'*BE*2*pi*xx ;
CE=CE+0.5*dete*w*H'*H*2*pi*xx;
Volumen=Volumen+dete*w*0.5*2*pi*xx;
end

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%Ensamblaje%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
El programa principal llama a ejecutar la Subrutina de ensamblaje en el
volumen
end

AreaNum=0;
Te=Tf*ones(nn_elem-1,1);

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%Integracion numérica en el borde%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
for m=1:length(borde2)
AreaAna=0;
Area=0;
KQ=zeros(gr_l*nn_elem-1);
F=zeros(gr_l*nn_elem-1,1);

%considero las coordenadas del elemento correspondiente
x1=coordenadas(1,borde2(1,m));
x2=coordenadas(1,borde2(2,m));

y1=coordenadas(2,borde2(1,m));
y2=coordenadas(2,borde2(2,m));

m1=(y2-y1);
m2=(x2-x1);

for i=1:pc

r=rg(i);
h1=0.5*(1-r);
h2=0.5*(1+r);

H=[h1,h2] ;

h1r=-0.5;
h2r=0.5;

dxdr=x1*h1r+x2*h2r;
dydr=y1*h1r+y2*h2r;
deter=sqrt(dxdr^2+dydr^2);

```

```
%%%Para un solido de revolucion
```

```
yy=x1*h1+x2*h2;
```

```
%%para 2d con revolucion
```

```
Area=Area+deter*p(i)*2*pi*yy;
```

```
F=F+ H'*h*H*Te*deter*p(i)*2*pi*yy;
```

```
KQ=KQ+ H'*h*H*deter*p(i)*2*pi*yy;
```

```
end
```

```
AreaNum=AreaNum+Area;
```

```
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
```

```
El programa principal llama a ejecutar la Subrutina de ensamblaje  
para elementos de borde
```

```
end
```

```
tcpu1=(cputime-tcpu0)/60;
```

```
H0=L;
```

Se llama a subrutina que resuelve ecuaciones diferenciales ordinarias (ODE) en Matlab. Se requieren los datos de KG, FG, KQtot, HO e intervalo de tiempo establecido del proceso.

```
Búsqueda de los puntos experimentales en la malla de triángulos para el  
calculo comparativo
```

```
A=xlsread('Congeladosexperimentos.xls')
```

```
TES=[nodes(1,:)',' nodes(2,:)',' nodes(3,:)'];
```

```
X=[grilla(:,1),grilla(:,2)];
```

```
t = tsearchn(X, TES, Xi);
```

```
k = dsearchn(X, TES, Xi);
```

```
nodoexp=k(1);
```

Transformacion de Entalpia a Temperatura para comparar ya que el programa resuelve en Entalpia

```
for i=1:length(tciclo)
```

```
    for m=1:length(k)
```

```
        Lelem=Hen(i,k(m));
```

```
Tu=interp1(Lkirch,Trango,Lelem);
```

```
Tpred(i,m)=Tu
```

```
    end
```

```
end
```

```
Comparacion de temperaturas experimentales y predichas por la simulación
```

```
Texp=A(:,4);
```

```
tiempoexp=A(:,1);
```

```
plot(tiempoexp,Texp,tciclo,Tpred(:,1),tciclo,Tpred(:,2),tciclo,Tpred(:,3)),  
legend('experimental','predicha1','predicha2','predicha3'))
```